

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : **P. LÉPINE**

TOME QUATRE-VINGT-CINQUIÈME

Juillet-Décembre 1953

QR

I

A475

v.85

July-Déc.

1953

PER

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 4, RUE CASSETTE. — 1953

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ROLE DU PHOSPHORE
DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE
DU BACTÉRIOPHAGE AUX RAYONS ULTRA-VIOLETS

par W. MUTSAARS.

(Université libre de Bruxelles,
Faculté de Médecine et de Pharmacie.)

Il a été démontré par Luria et Latarjet [1] que la résistance du bactériophage intracellulaire aux radiations ultra-violettes augmente avec le temps. Benzer [2] a observé que cet accroissement de résistance ne se produit qu'en présence d'un milieu nutritif ; une suspension en solution tampon ne présente aucune modification de la résistance, mais l'addition de bouillon détermine une augmentation presque immédiate. Cette augmentation de résistance aux radiations ultra-violettes, qui s'observe également en ce qui concerne les rayons X (Latarjet [3]), témoin du développement intracellulaire du bactériophage, en est, jusqu'à présent, après la fixation de la particule sur le germe sensible, la première manifestation accessible à l'expérimentation.

BACTÉRIOPHAGES UTILISÉS.

Au cours de cette étude nous avons utilisé le bactériophage anticolon ϕ N et le colibacille correspondant, déjà employés au

cours d'autres expériences [4, 5], ainsi que les bactériophages de la série T1 à T7 et le coli B correspondant (1).

TECHNIQUE EMPLOYÉE.

Nous avons utilisé les milieux nutritifs suivants :

Milieux liquides :

1^o Infusion de cœur de bœuf et de cerveau de veau (Brain Heart Infusion DIFCO). Ce milieu est riche en phosphate, il contient par litre 2,5 g de phosphate bisodique. Nous l'appellerons en abrégé milieu BHI.

2^o Extrait de viande de bœuf peptoné (Bacto Nutrient Broth DIFCO), en abrégé NB.

Milieu solide : Bacto Heart Infusion Agar DIFCO.

On ensemence un ballon contenant 50 ml de milieu nutritif liquide approprié avec 1 goutte d'une culture de vingt-quatre heures de colibacille. Après séjour de quatre heures au bain-marie à 38°, on centrifuge 35 ml de la culture jeune ainsi obtenue, et, après rejet du liquide surnageant, on resuspend le culot de centrifugation dans un ballon A contenant 30 ml du milieu nutritif à expérimenter.

On prépare, d'autre part, dans un ballon B, une dilution appropriée de bactériophage, dans 30 ml du même milieu nutritif. L'expérience se déroule à 38° au bain-marie et débute au moment où l'on mélange le contenu des ballons A et B, qui ont été eux-mêmes maintenus à la température de 38° au bain-marie. Etant donné le nombre considérable de colibacilles par rapport à celui des particules de bactériophage, chacun des germes infectés ne l'est que par une seule particule. Dans certains cas, toutes choses restant égales par ailleurs, on utilise des quantités doubles de mélange.

A la minute zéro on prélève 5 cm³ du mélange, on irradie ce prélèvement à l'aide d'une lampe en quartz à vapeur de mercure, sous une couche mince dans une boîte de Petri, à l'air libre et en agitant. Un autre prélèvement simultané de 3 cm³ est titré tel quel, sans irradiation. On poursuit les prélèvements à intervalles réguliers, les temps d'irradiation des échantillons de 5 cm³ étant, bien entendu, constants pour toute la durée de l'expérience. Les titrages se font sans tarder, par la méthode de Gratia, en introduisant 0,9 cm³ du mélange dans un tube contenant environ 5 cm³ de gélose à 0,6 p. 100 maintenue liquide dans un bain-marie à 50°. Le tout est aussitôt coulé dans une boîte de Petri contenant de

(1) Nous tenons à remercier le Dr P. Fredericq qui nous a aimablement transmis les bactériophages de la série T ainsi que le coli B correspondant.

la gélose ordinaire Bacto Heart Infusion Agar. Les titrages ont été faits en double, et parfois en quadruple exemplaire.

On calcule le taux de dilution du bactériophage pour que 0,9 cm³ du mélange, coulé en boîte de Petri, fournisse un nombre de taches de bactériophage suffisamment grand tout en restant facile à compter (de 200 à 400 taches par boîte).

Un premier essai a été réalisé en utilisant les milieux suivants

Colibacille : culture de quatre heures en BHI. Centrifugation, resuspension du culot dans 60 ml d'eau physiologique contenant 10 p. 100 de BHI.

Bactériophage ϕ N dilué dans 60 ml d'eau physiologique contenant 10 p. 100 de BHI.

Prélèvements de deux en deux minutes, irradiations d'une durée de dix secondes. Nous donnons ci-dessous un résultat d'expérience, chaque chiffre étant le total des taches de bactériophages comptées sur deux boîtes de Petri, provenant donc de 1,8 cm³ de mélange.

TABLEAU I.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	450	20
2	420	30
4	380	40
6	380	100
8	350	150
10	290	160
12	320	160
14	290	150
16	320	160
18	340	160
20	400	160

La résistance du bactériophage ϕ N aux radiations ultra-violettes augmente donc considérablement au cours de son développement intracellulaire, ceci même dans un milieu ne contenant que 10 p. 100 de bouillon. Il est à remarquer que la période de latence de ce bactériophage est de dix-sept minutes environ, la période d'augmentation (rise period) étant d'environ douze minutes. Dans ce milieu le maximum de résistance aux U.-V. est atteint dès la huitième minute.

COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE ϕ N EN MILIEU PAUVRE EN PHOSPHATE.

Colibacille : culture comme précédemment, en milieu BHI.

Culot resuspendu en milieu NB non dilué.

Bactériophage ϕ N en milieu NB non dilué.

Nous avons fait 10 expériences identiques ; nous donnons la somme des plages de bactériophagie comptées au cours de ces 10 essais.

TABLEAU II. — **Milieu expérimental : NB.**

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	4 590	360
2	3 880	350
4	3 380	360
6	3 115	320
8	2 860	340
10	2 670	365
12	2 400	350
14	2 490	310
16	2 410	325
18	2 240	270
20	2 260	285

On observe que dans ce milieu il n'y a aucune augmentation de la résistance aux U.-V. du bactériophage intracellulaire. Bien au contraire, on remarque une légère diminution du nombre de particules survivant après irradiation ; en effet, dans cette série, on ne trouve après six minutes que 88 p. 100 du nombre de particules à la minute 0 ; après dix minutes on en observe 101 p. 100, après seize minutes 90,2 p. 100 et après vingt minutes 79,1 p. 100. La chute du nombre de taches dans la série témoin non irradiée est sensiblement plus forte : à six minutes on n'a plus que 67,8 p. 100 du nombre initial de taches, à dix minutes 58,1 p. 100, à seize minutes 52,5 p. 100 et à vingt minutes 49,2 p. 100. Il semble donc qu'au cours de leur séjour dans ce milieu, un certain nombre de particules intracellulaires, loin d'aboutir à un développement normal se signalant par une résistance accrue aux U.-V., perdent au contraire leur capacité de multiplication, c'est-à-dire de donner en dernière analyse naissance à une plage de bactériophagie.

COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE ϕ N EN MILIEU ENRICHÉ EN PHOSPHATE.

Au cours d'essais ayant pour but de déterminer quel était le facteur dont l'absence ou le taux insuffisant rendait le milieu NB impropre à l'observation du phénomène signalé par Luria et Latarjet, nous avons remarqué que l'addition d'une certaine quantité d'orthophosphate bisodique permettait d'obtenir le résultat recherché.

Colibacille : culture en milieu BHI.

Culot de centrifugation ressuspended en milieu NB, non dilué, contenant 0,45 p. 100 de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H.12H}_2\text{O}$.

Bactériophage : dilution dans milieu NB phosphaté à 0,45 p. 100.

Le tableau III résume le total de 10 expériences.

TABLEAU III. — Milieu expérimental :
NB + $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H.12H}_2\text{O}$ à 0,45 p. 100.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	5 560	630
2	5 760	4 430
4	6 230	1 910
6	6 290	2 560
8	6 390	3 150
10	6 290	3 575
12	6 260	3 830
14	6 420	4 060
16	6 330	3 915
18	6 495	3 850
20	6 500	3 790

Les pourcentages du nombre de plages par rapport au nombre initial s'établissent, pour les prélèvements non irradiés, à 113 p. 100 après six minutes, 113 p. 100 après dix minutes, 113,8 p. 100 après seize minutes et 116 p. 100 après vingt minutes. L'augmentation du nombre total de particules viables est donc minime, le maximum étant atteint assez rapidement. Les pourcentages des prélèvements irradiés sont, pour les mêmes temps, respectivement de 406, 567, 622 et 601 p. 100. Ici l'augmentation du nombre de plages est très considérable, elle dépasse largement la légère augmentation observée dans les prélèvements non irradiés, elle ne peut être attribuée à cette dernière augmentation, mais est bien due à un accroissement de la résistance aux rayons ultra-violets.

L'addition de phosphate bisodique au milieu NB confère donc à celui-ci des qualités permettant le développement intracellulaire du bactériophage φN .

Si nous comparons par paires les 10 expériences du type NB avec les 10 expériences du type NB phosphaté, en nous tenant aux résultats de vingt minutes et en adoptant l'hypothèse 0 : aucune influence du phosphate sur la résistance aux rayons ultra-violets, nous pouvons établir le χ^2 pour ces 10 paires d'essais. Le χ^2 le plus élevé ainsi obtenu est de 338 et le plus bas de 67,9, ce qui pour un degré de liberté, est très inférieur à la probabilité de 0,001. Les différences observées entre les résultats du type NB et NB phosphaté sont donc très significatives.

D'ailleurs, si l'on calcule l'erreur standard de la différence σ_w et, d'autre part, la différence de proportions de particules inactivées dans le groupe phosphaté par rapport au groupe non phosphaté, nous obtenons comme chiffre le plus bas pour les 10 paires d'essais un σ_w de 0,0317 et une différence en proportions de 0,3683, ce qui équivaut à 9,38 fois l'erreur standard. Les chiffres les plus élevés sont de σ_w 0,0317, différence en proportions de 0,5866, soit 18,5 fois l'erreur standard. L'accroissement de la résistance aux rayons ultra-violets est donc bien liée à la présence du phosphate. Notons qu'une expérience faite dans les mêmes conditions, à savoir en milieu NB phosphaté à 0,45 p. 100, mais avec addition au milieu de nitrate de calcium M/100, donne des résultats très différents.

TABLEAU IV. — Milieu expérimental :
NB + $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$. 12 H_2O + $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	249	30
10	209	25
20	218	60

Le peu de solubilité du PO_4CaH empêche évidemment son utilisation. D'autre part, l'effet du phosphate bisodique se fait encore sentir si nous l'ajoutons après le début de l'expérience, à un moment où la fixation du bactériophage et sa pénétration dans le germe se sont produits. Nous donnons ici les résultats d'une expérience où l'addition du phosphate s'est opérée huit minutes après le début de l'essai. La concentration du phosphate étant la même que dans les expériences précédentes.

TABLEAU V. — Milieu expérimental :
NB d'abord, + 0,45 p. 100 $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 12 H_2O après huit minutes.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	510	30
2	490	20
4	465	20
6	450	50
8	420	30
10	360	70
12	350	100
14	400	120
16	400	160
18	370	200
20	380	180

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE D'ORIGINE DU COLIBACILLE.

Dans cette série de 10 expériences identiques, nous avons voulu rechercher si l'utilisation d'une suspension de colibacilles obtenus par culture dans un milieu pauvre en phosphate pouvait influencer le phénomène de Luria et Latarjet. A cet effet, la culture en colibacille a été réalisée dans un milieu NB sans addition de phosphate, au lieu du milieu BHI habituel. On centrifuge la culture après séjour de quatre heures au bain-marie à 38°, le culot étant resuspendu dans du milieu NB phosphaté à 0,45 p. 100, la suspension de bactériophage étant également en milieu NB phosphaté. Le tableau VI donne le total des 10 expériences.

Le nombre de plaques dans la série témoin non irradiée ne varie guère ; il est, après six minutes, de 103 p. 100 par rapport à l'origine ; après dix minutes de 98,7 p. 100, après seize minutes de 101 p. 100 et après vingt minutes de 104 p. 100. Il y a une augmentation très considérable du nombre de particules résistantes, il passe à 256 p. 100 après six minutes, pour atteindre respectivement 403 p. 100, 548 p. 100 et 552 p. 100 après dix, seize et vingt minutes.

TABLEAU VI. — Origine du colibacille : milieu NB
Milieu expérimental : NB + $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H.12 H}_2\text{O}$ à 0,45 p. 100.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	5 380	565
2	5 280	660
4	5 400	1 020
6	5 550	1 450
8	5 320	1 915
10	5 310	2 280
12	5 430	2 630
14	5 460	2 720
16	5 470	3 100
18	5 330	3 145
20	5 620	3 420

Si nous comparons ces résultats à ceux du tableau III, nous pouvons en conclure que la substitution de colibacilles cultivés en milieu BN sans phosphate à des colibacilles cultivés en milieu BHI ne supprime pas l'augmentation de la résistance aux rayons ultra-violets. Tout au plus observe-t-on une diminution de la vitesse de la réaction. Au cours des essais du tableau III (colibacille provenant d'un milieu BHI), le plateau est atteint à la douzième minute, il n'y a stabilisation du nombre de plages de bactériophage que vers la seizième minute pour les essais du

tableau VI. Le calcul du χ^2 basé sur les résultats de vingt minutes, et partant de l'hypothèse que le milieu dans lequel on a cultivé le colibacille n'exerce aucune influence sur l'augmentation des résistants aux rayons ultra-violets, ne donne pas de résultats probants, mais ce même calcul établi pour les résultats de deux minutes par exemple, en comparant donc paire par paire les expériences du tableau III avec celles du tableau VI, fournit des résultats convaincants. En effet, la somme des χ^2 est de 231,8, ce qui, pour 9 degrés de liberté (10 paires d'expériences), donne une probabilité inférieure à 0,001. L'influence du milieu existe donc nettement au début de l'expérience.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PHOSPHATE BISODIQUE.

Pour l'étude de cette influence, nous préparons une dilution appropriée de bactériophage φN en milieu NB non phosphaté, nous introduisons 7 ml de cette dilution dans 6 tubes numérotés de 1 à 6. Nous préparons 6 autres tubes numérotés de même, et contenant chacun 6,5 ml des liquides suivants :

Tube 1	Milieu NB non phosphaté.
Tube 2	Milieu NB + phosphate bisodique à 0,043 p. 100.
Tube 3	Milieu NB + — — à 0,225 p. 100.
Tube 4	Milieu NB + — — à 0,45 p. 100.
Tube 5	Milieu NB + — — à 2,25 p. 100.
Tube 6	Milieu NB + — — à 4,5 p. 100.

On centrifuge 60 ml d'une culture de quatre heures de colibacille en milieu BHI, le culot est repris dans 6 ml de milieu NB non phosphaté et réparti ensuite, à raison de 0,5 ml par tube, dans la série de tubes à concentration croissante en phosphate. A la minute 0 on mélange les tubes contenant du colibacille à ceux contenant du bactériophage, et, après séjour de quinze minutes au bain-marie à 38°, on titre des prélèvements irradiés et non irradiés. La dilution en phosphate des mélanges étant doublée par l'apport des tubes contenant le bactériophage, on a finalement les séries suivantes.

TABLEAU VII.

	CONCENTRATION EN PHOSPHATE					
	0	0,022 p. 100	0,11 p. 100	0,22 p. 100	1,12 p. 100	2 p. 100
Non irradié	3 575	3 590	3 980	4 480	7 035	4 250
Irradié 10 secondes.	640	800	1 560	2 250	4 990	2 420

L'examen de la série non irradiée nous révèle déjà l'influence des variations de la teneur en phosphate, qui, s'ébauchant à la concentration de 0,11 p. 100, atteint son apogée à 1,1 p. 100, 2,2 s'avérant déjà moins favorable. Nous n'avons pas fait de titrage au départ de l'expérience, nous savons qu'en milieu non phosphaté il y a, après quinze minutes, diminution assez considérable du nombre de particules intracellulaires viables par rapport à celui du temps 0 (*Cf. tableau II*), d'autre part, en milieu phosphaté il y a augmentation de ce nombre. Ces tendances opposées se sont manifestées ici également ; il en résulte que, par rapport à l'essai en milieu NB non phosphaté, le nombre de particules viables en milieu phosphaté à 1,1 p. 100 a doublé à peu de chose près. L'examen de la série irradiée nous révèle une influence proportionnellement bien plus forte du phosphate. En effet, si nous comparons, dans le groupe non phosphaté, l'ensemble des essais non irradiés à celui des irradiés, nous obtenons pour ce dernier un rapport de 17,9 p. 100 du nombre de plages non irradiées. Ce rapport ne fait que croître : il atteint 22,29 p. 100 avec une teneur en phosphate de 0,022 p. 100, il atteint ensuite 39,2 p. 100, 50,2 p. 100 et, après avoir culminé à 70,93 p. 100 pour une teneur de 1,12 p. 100, il redescend à 56,94 p. 100.

Le nombre de particules intracellulaires résistant aux U.-V. (après quinze minutes de séjour à 38°) croît donc plus rapidement que le nombre total de particules viables, quand la teneur en phosphate augmente.

ACTION DU PHOSPHATE BIPOTASSIQUE.

Nous avons utilisé, pour ces essais, toutes autres conditions restant égales, un milieu NB contenant 0,5 p. 100 de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$. Cette modification n'influe pas sur l'accroissement de la résistance.

TABLEAU VIII.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	656	46
6	590	300
10	670	440
16	730	510
20	640	470

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE SODIQUE.

Ces essais, qui au point de vue technique, sont calqués sur ceux figurant au tableau VII, ont été exécutés en faisant varier

la concentration en NaCl. Les titrages sont faits après séjour de quinze minutes au bain-marie à 38° ; le tableau IX donne le total de 10 expériences.

TABLEAU IX.

	CONCENTRATION SUPPLÉMENTAIRE EN NaCl					
	0	0,045 p. 100	0,925 p. 100	0,45 p. 100	2,35 p. 100	4,5 p. 100
Non irradié	2 820	2 930	2 975	2 740	2 830	2 750
Irradié 10 secondes . . .	390	470	590	850	90	25

Les quantités croissantes de NaCl ne font guère augmenter le nombre total de particules viables ; quant au pourcentage des particules résistantes par rapport aux totaux non irradiés, on obtient les chiffres suivants : 13,83 p. 100, 16,04 p. 100, 19,83 p. 100, 31,12 p. 100, 3,18 p. 100 et 0,909 p. 100. L'augmentation du taux de NaCl détermine indubitablement un accroissement du nombre de particules résistantes, qui double par rapport au témoin sans NaCl supplémentaire, mais en présence de phosphate bisodique isotonique ce nombre quadruplait. De plus, une chute massive s'observe dès que l'optimum est dépassé.

COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE φN EN MILIEU GLYCÉROPHOSPHATÉ.

On utilise, comme d'habitude, une culture de colibacille âgée de 4 heures en milieu BHI, centrifugée ; le culot est resuspendu dans 60 ml de milieu NB auquel on a incorporé du β glycéro-phosphate de sodium à 0,5 p. 100. On a préparé dans 60 ml du même milieu une dilution appropriée de bactériophage φN , le mélange se faisant à la minute 0. Le tableau X donne les résultats de 10 essais.

Le nombre de particules viables ne se modifie pas pendant la durée de l'expérience ; après six, dix, seize et vingt minutes, les pourcentages par rapport au temps 0 sont respectivement de 100, 97,6, 97,3 et 99,6. Rappelons qu'on assiste à un accroissement minime de ce nombre quand on utilise du phosphate minéral : 116 p. 100 après vingt minutes.

Mais le milieu glycérophosphaté permet certainement au bactériophage intracellulaire d'augmenter sa résistance aux U.-V., puisque le pourcentage du nombre de particules résistantes passe

TABLEAU X. — Milieu expérimental :
NB + β glycérophosphate de sodium 0,5 p. 100.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	3 000	330
2	3 150	440
4	3 150	550
6	3 000	790
8	2 995	900
10	2 930	1 060
12	3 030	1 180
14	2 920	1 280
16	2 920	1 300
18	2 870	1 295
20	2 990	1 240

ici de 239 p. 100 à 321 p. 100, à 393 p. 100 et à 375 p. 100 après vingt minutes. Cet accroissement, moins important que dans le cas du milieu phosphaté, n'en est pas moins appréciable.

Les γ^2 établis essai par essai, en comparant les 10 résultats de vingt minutes en milieu NB glycérophosphaté avec les 10 résultats en milieu BN (résultats totalisés dans le tableau II), s'échelonnent entre 14,6 pour le plus bas et 116 pour le plus élevé. Avec un seul degré de liberté de tels chiffres sont hautement significatifs, le hasard ne pourrait les provoquer qu'avec une probabilité inférieure à 0,001. La somme des χ^2 est de 588,2 (10 paires d'expériences).

La différence en proportions entre les deux expériences, prises paire par paire, divisée par l'erreur standard de la différence en proportions, va de 3,62 à 18,6 (moyenne de 8,4).

La glycérophosphatase du colibacille, dans lequel le bactériophage φN poursuit son développement, semble donc bien conserver toute son activité.

COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE φN EN MILIEU PYROPHOSPHATÉ.

L'augmentation de la résistance des particules aux U.-V. s'obtient également dans un milieu NB contenant du $Na_4P_2O_7$. 10 H_2O à raison de 0,67 p. 100, ce qui correspond à une solution $1,5 \cdot 10^{-2}$. Ce milieu, très alcalin, est ramené au pH 7,4 et filtré sur filtre Seitz. Les chiffres du tableau XI sont des totaux résultant de 6 expériences.

En milieu pyrophosphaté, le total de particules viables passe, après six minutes, à 133 p. 100 du chiffre initial ; il ne se modifie plus guère après, puisque nous avons successivement 141 p. 100, 135 p. 100 et 138 p. 100 après dix, seize et vingt minutes.

TABLEAU XI. — Milieu expérimental NB + pyrophosphate de sodium.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	2 380	700
2	3 130	860
4	3 240	1 040
6	3 180	1 380
8	3 150	1 615
10	3 370	1 860
12	3 200	1 870
14	3 260	2 020
16	3 220	1 950
18	3 200	1 950
20	3 300	1 730

Le nombre de particules résistant aux U.-V. atteint 198 p. 100 après six minutes, 267 p. 100 après dix minutes, 280 p. 100 après seize et 252 p. 100 après vingt minutes. L'augmentation de la résistance est moins accentuée qu'en milieu phosphaté (552 p. 100 après vingt minutes) ou qu'en milieu glycérophosphaté (375 p. 100 après vingt minutes). Les χ^2 pris essai par essai, en comparant les expériences en milieu NB-pyrophosphaté avec celles réalisées en milieu NB, s'échelonnent entre 902 (maximum) et 14 (minimum). La pyrophosphatase est donc active dans le colibacille parasité.

INFLUENCE DE L'ION Mg^{++} .

Les phosphatases alcalines sont peu fréquentes chez les bactéries selon Paget et Vittu [6]; chez *Esch. coli*, les phosphatases seraient du type III et IV. Ces auteurs ont utilisé des cultures notamment plus vieilles (dix-huit à vingt-quatre heures) que celles que nous avons employées (quatre heures). Employant comme substrat de l' α et du β glycérophosphate, ils ont observé une influence nette des ions Mg^{++} M/100, dépendant du pH, le magnésium serait inhibiteur entre 3,6 et 5,4 et activateur entre 7,8 et 9,2.

A deux ballons A et B contenant chacun 32 ml d'une dilution appropriée de bactériophage ϕN en milieu NB + β glycérophosphate de sodium à 0,5 p. 100, on ajoute respectivement 8 ml de milieu NB contenant $SO_4Mg.7 H_2O$ M/20; 8 ml de milieu NB. On dispose ainsi de deux ballons contenant chacun 10 ml de bactériophage dilué, le ballon 1 contenant en plus du sulfate de magnésium M/100. A la minute 0 on ajoute à chacun des deux ballons 40 ml d'une suspension de colibacilles en milieu NB glycérophosphaté, obtenue par centrifugation d'une

culture de quatre heures en milieu BHI et resuspendue en milieu NB glycérophosphaté. Nous donnons dans le tableau XII les résultats de deux essais.

TABLEAU XII. — Milieu expérimental :
NB + β glycérophosphate à 0,5 p. 100.

MINUTES	AVEC SO_4Mg M/200		SANS SO_4Mg	
	Non irradié	Irradié 10 secondes	Non irradié	Irradié 10 secondes
0	155	63	188	83
10		46		93
20	101	60	169	130
0	516	76	483	75
10		111		197
20	385	176	538	466

Même à la dilution M/1 000, le sulfate de magnésium exerce encore un effet inhibiteur sensible, ainsi qu'en témoigne le tableau XIII.

TABLEAU XIII. — Milieu expérimental : Voir tableau XII.

MINUTES	AVEC SO_4Mg M/1 000		SANS SO_4Mg	
	Non irradié	Irradié 10 secondes	Non irradié	Irradié 10 secondes
0	538	69	540	57
10	378	165	486	223
20		286		336

Les χ^2 des deux expériences relatées au tableau XIII sont de 8,96 et de 177 pour les prélèvements de vingt minutes, ce qui correspond à des probabilités respectivement inférieures à 0,01 et inférieures à 0,001.

Les résultats sont donc significatifs, l'action inhibitrice de l'ion Mg est bien réelle. Cet effet se produit-il par l'inhibition d'une phosphomonoestérase de type acide ?

L'effet de l'ion Mg^{++} est également sensible en milieu NB phosphaté. Une expérience menée comme les précédentes donne les résultats suivants.

Avec une dilution à M/200 du SO_4Mg , l'effet inhibiteur se fait

TABLEAU XIV. — Milieu expérimental
NB + $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ à 0,45 p. 100.

MINUTES	AVEC SO_4Mg M/100		SANS SO_4Mg	
	Non irradié	Irradié 10 secondes	Non irradié	Irradié 10 secondes
0	482	86	491	77
2		67		121
4		67		168
6		63		192
8		99		301
10		88		391
12		69		469
14		92		502
16		110		516
18		90		546
20	290	90	605	551

encore sentir. Nous ne donnons que les chiffres initiaux et terminaux : série A (Mg), zéro minute non irradiée, 448 ; irradiée, 57. Série B (sans Mg), zéro minute non irradiée, 468 ; irradiée, 94. Après vingt minutes, série A non irradiée, 320 ; irradiée, 181. Série B non irradiée, 647 ; irradiée, 550.

Nous avons obtenu des effets analogues en utilisant du chlorure de magnésium M/200.

TABLEAU XV. — Milieu NB + $\text{PO}_4\text{NaH} \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$.

MINUTES	AVEC MgCl_2 M/200		SANS MgCl_2	
	Non irradié	Irradié 10 secondes	Non irradié	Irradié 10 secondes
0	688	163	753	147
20	574	240	875	782

L'inhibition exercée en milieu NB + phosphate inorganique par les ions Mg^{++} pourrait s'expliquer, comme celle observée en présence de Ca^{++} , par la formation d'un sel peu soluble, en l'occurrence de l'orthophosphate de magnésium. Mais ces remarques ne s'appliquent pas aux essais en milieu NB + β glycérophosphate du bouillon.

INFLUENCE DE L'ION Be^{++} .

Dubois [7] a signalé une inhibition des phosphatasées alcalines par le beryllium. Nous avons pu obtenir une inhibition de

l'augmentation de la résistance des particules de bactériophage aux U.-V., en milieu NB phosphaté, en y incorporant du sulfate de beryllium M/200.

TABLEAU XVI. — Milieu expérimental : NB + $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$.
12 H_2O 0,45 p. 100.

MINUTES	AVEC SO_4Be M/200		SANS SO_4Be	
	Non irradié	Irradié 10 secondes	Non irradié	Irradié 10 secondes
0	438	72	658	149
6		83		264
10		89		388
16		139		588
20	246	172	829	717

Le χ^2 de cette expérience (prélèvements de vingt minutes) est de 36,4, pour 1 degré de liberté, chiffre hautement significatif.

INFLUENCE DE LA CYSTÉINE.

Nous avons signalé antérieurement l'action de la cystéine [8] sur le bactériophage φN . Nous avons observé une action inhibitrice sur le développement de la résistance aux U.-V. du bactériophage intracellulaire en milieu NB glycérophosphaté à 0,5 p. 100. Nous y avons incorporé de la cystéine M/50 ; la technique suivie est identique à celle des expériences en milieu NB glycérophosphaté (tableau X). Le tableau XVII résume 10 essais.

TABLEAU XVII. — Milieu expérimental ;
NB + Glycérophosphate de Na 0,5 p. 100 + Cystéine M/50.

MINUTES	NON IRRADIÉ	IRRADIÉ 10 SECONDES
0	3 670	410
2	3 500	360
4	3 580	360
6	3 300	330
8	3 390	430
10	3 310	440
12	3 020	420
14	3 170	450
16	3 020	390
18	3 230	390
20	3 050	360

La cystéine a donc nettement inhibé l'augmentation de la résistance (Cf. tableau X). Il n'y a guère de modification du nombre de particules résistantes ; il est de 80,5 p. 100 du nombre initial après six minutes, de 107 p. 100 après dix minutes, et de 95,1 et 87,8 après seize et vingt minutes.

La comparaison des essais en milieu glycérophosphaté avec et sans cystéine donne des χ^2 allant de 7,44 pour le plus bas à 131,4 pour le plus élevé, la somme des χ^2 pour les 10 paires d'essais étant de 552,47, ce qui, pour 9 degrés de liberté, est largement inférieur à la probabilité de 0,001. Les chiffres obtenus en milieu glycérophosphaté cystéiné sont donc significatifs.

Des essais exécutés en milieu NB phosphaté, en présence d'acide thioglycolique M/100 ou M/50, ont montré que ce produit n'avait aucun effet inhibiteur.

L'utilisation de NaF M/100 en milieu NB + 0,45 PO₄Na₂H. 12 H₂O ou NB + β glycérophosphate 0,5 p. 100 ne nous a pas permis de déceler une inhibition. Tout au plus observe-t-on au cours des six premières minutes de l'expérience, un léger retard dans le développement de la résistance aux U.-V.

LES BACTÉRIOPHAGES DE LA SÉRIE T.

Les résultats dont il a été fait mention jusqu'à présent ont été obtenus en utilisant le bactériophage φ N. Nous avons étudié également le comportement en milieu NB non phosphaté des bactériophages de la série T, en utilisant le coli B correspondant.

N'ayant pas changé de technique pour cette étude, nous nous contenterons de donner les résultats. Ces résultats permettent de classer les 7 bactériophages envisagés en deux groupes bien distincts, avec un groupe intermédiaire constitué par le T5.

Le premier groupe comporte les bactériophages à grandes taches, impairs, T1, T3 et T7.

Nous donnons les résultats totaux, comportant 10 essais pour chaque bactériophage, les prélèvements étant effectués après zéro, cinq, dix et vingt minutes. Il est à remarquer que la période de latence pour ces trois bactériophages est de treize minutes, les résultats de quinze et vingt minutes dépassent donc cette période.

Il est donc vraisemblable que les résultats après vingt minutes de séjour à 38° ne comportent pas uniquement des particules en période de latence, mais qu'un début de libération de bactériophage de néoformation s'est produit, le brusque saut en cinq minutes de 4 800 particules à 8 400 dans le cas du T7 en est l'exemple le plus marquant. Nous négligerons ces résultats, ainsi que ceux des prélèvements de quinze minutes. Il n'en reste pas moins que ces trois bactériophages ont un comportement très différent de celui du φ N en milieu NB non phosphaté. Par rapport

TABLEAU XVIII. — Milieu expérimental : NB sans phosphates.

MINUTES	NON IRRADIÉS			IRRADIÉS		
	T 1	T 3	T 7	T 1 20 secondes	T 3 15 secondes	T 7 20 secondes
	—	—	—	—	—	—
0	1 830	11 140	3 240	950	5 750	850
5	2 690	—	4 280	4 870	—	4 380
10	3 060	17 500	4 650	2 410	14 570	4 850
15	3 070	—	4 840	2 700	—	2 340
20	4 120	23 030	8 450	3 370	16 100	3 050

au nombre de particules au temps zéro, pris comme référence de base, nous donnons ci-après les pourcentages tant pour les prélèvements non irradiés que pour les irradiés, après cinq et dix minutes.

MINUTES	NON IRRADIÉS			IRRADIÉS		
	T 1 p. 100	T 3 p. 100	T 7 p. 100	T 1 20 secondes p. 100	T 3 15 secondes p. 100	T 7 20 secondes p. 100
	—	—	—	—	—	—
5	143	—	132	192	—	162
10	167	157	143	253	253	217

Ces trois bactériophages manifestent donc, au cours de leur période de latence intracellulaire, une augmentation manifeste de leur résistance aux U.-V., alors que l'expérience se déroule dans un milieu NB sans addition de phosphate.

Dans le second groupe, nous retrouvons les bactériophages

TABLEAU XIX. — Milieu expérimental : NB sans phosphate.

MINUTES	NON IRRADIÉS			IRRADIÉS		
	T 2	T 4	T 6	T 2 15 secondes	T 4 20 secondes	T 6 20 secondes
	—	—	—	—	—	—
0	12 200	7 850	5 230	4 060	5 340	680
5	—	7 400	4 330	—	5 500	730
10	12 260	7 670	3 920	4 640	5 330	530
15	—	7 560	3 620	—	5 700	600
20	11 800	7 535	3 650	4 510	5 600	580

pairs, à petites taches, T2, T4 et T6. Ceux-ci se comportent, en milieu NB sans phosphate, exactement comme le bactériophage ϕ N, à petites taches également.

Les temps de latence de ces bactériophages sont de vingt et une, vingt-quatre et vingt-cinq minutes respectivement pour le T2, le T4 et le T6. Nous ne retiendrons cependant que les résultats de cinq et de dix minutes. Les pourcentages pour ces temps s'établissent comme suit :

MINUTES	NON IRRADIÉS			IRRADIÉS		
	T2 p. 100	T4 p. 100	T6 p. 100	T2 15 secondes p. 100	T4 20 secondes p. 100	T6 20 secondes p. 100
	5	95	80,9	114	103	107
10	400	97	74,9		99,7	77,9

Ce groupe ne présente donc aucune augmentation de la résistance aux U.-V. Dans le cas du T6, il y a même une diminution notable du nombre de particules résistantes, qui va d'ailleurs de pair avec une diminution notable du nombre total de particules viables. Le bactériophage T5, tout en se rapprochant plutôt du deuxième groupe, manifeste cependant une légère augmentation de la résistance aux U.-V. Le tableau XX donne les totaux de 10 expériences.

TABLEAUX XX. — Milieu expérimental : NB sans phosphate.

MINUTES	NON IRRADIÉS	IRRADIÉS 10 SECONDES
0	6 420	2 850
5	6 690	3 250
10	6 390	3 640
15	6 740	4 470

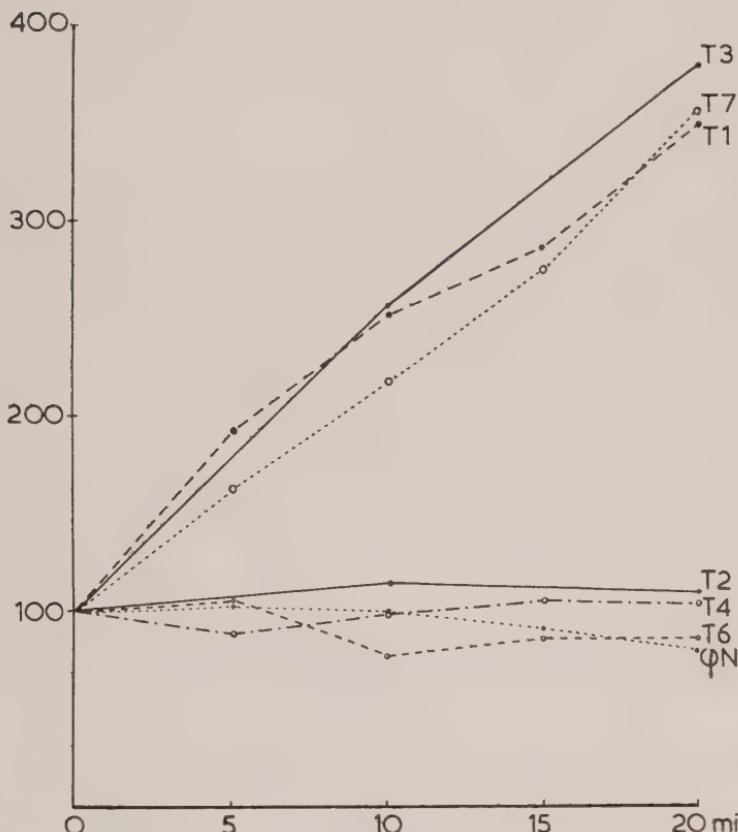
Les pourcentages sont :

MINUTES	NON IRRADIÉS p. 100	IRRADIÉS 20 SECONDES p. 100
5	104	114
10	99,5	127

Nous avons résumé dans un graphique, en fonction du temps, les résultats, calculés en pourcentages, des prélèvements irradiés des bactériophages de la série T ainsi que du ϕ N.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats des observations de Cohen [9] et de Kozloff et Putnam [10].

Cohen a étudié l'utilisation du phosphore par les bactério-



Courbes indiquant les augmentations de résistance aux rayons U.V. des bactériophages intra-cellulaires de la série T et ϕ N.

Milieu NB pauvre en phosphate.

Le nombre initial de particules a été, dans chaque cas, ramené à 100 et les autres chiffres réduits dans les mêmes proportions.

phages T2 et T4, grâce à la technique des isotopes radioactifs. Il a suivi la synthèse de ces bactériophages dans un milieu contenant du phosphore radioactif, en présence de coli B obtenu d'autre part dans un milieu sans ^{32}P . Dans ces conditions, la

radioactivité de ces bactériophages est de 70 à 75 p. 100 de celle du phosphate inorganique du milieu. Le phosphore utilisé lors de la synthèse du T2 et du T4 provient donc en grande partie du milieu. Kozloff et Putnam, qui ont étudié le T6, ont constaté que le phosphate inorganique du milieu est à l'origine de 70 à 80 p. 100 du P de ce bactériophage. Par contre, Labaw [11] observe qu'au cours de la synthèse d'une particule de bactériophage, une fraction à peu près constante du phosphore provient de la cellule microbienne ; la fraction provenant du milieu extérieur varie, au contraire, selon les bactériophages, ceux du groupe impair n'en prenant qu'une faible fraction, ceux de la série paire un pourcentage plus considérable.

Nos résultats s'accordent fort bien avec ceux de ces auteurs. L'utilisation du phosphore inorganique du milieu extérieur débute donc, dès la pénétration de la particule de bactériophage (T2, T4, T6), dans la cellule microbienne. Si le milieu extérieur est pauvre en phosphore (cas du milieu NB), l'augmentation de la résistance aux U.-V., témoin de cette utilisation, ne se fait pas. Les bactériophages impairs T1, T3, T7 et, jusqu'à un certain point, le T5 peuvent développer leur résistance aux U.-V. dans un milieu pauvre en phosphore inorganique, ils utilisent en ordre principal le phosphore microbien, inorganique ou provenant de l'acide désoxyribonucléique de la cellule.

Comme le bactériophage φ N, les bactériophages du groupe pair, mis en milieu NB phosphaté, voient leur résistance aux U.-V. augmenter. Nous donnons, à titre d'exemple, un résultat obtenu avec le T2.

TABLEAU XXI. — Milieu NB + phosphate bisodique à 0,45 p. 100.

MINUTES	NON IRRADIÉS	IRRADIÉS 20 SECONDES
0	470	60
6	340	110
10	390	150
16	420	175
20	420	190

Le nombre de particules résistant aux U.-V. a donc augmenté de 300 p. 100 environ.

Nous avons vu que la cystéine empêchait l'augmentation de la résistance du bactériophage φ N intracellulaire, dans un milieu NB glycérophosphaté.

Nous avons voulu observer si la cystéine M/50 empêchait également l'augmentation de la résistance d'un bactériophage impair

tel que le T3, placé en milieu NB sans phosphate. Il n'en est rien, comme on peut le constater d'après le tableau XXII.

TABLEAU XXII. — **Milieu expérimental : NB + cystéine M/50.**
Bactériophage T3.

MINUTES	NON IRRADIÉS	IRRADIÉS 15 SECONDES
0	424	257
5	661	425
10	646	560
15	690	575
20	666	625

Par rapport à la situation à la minute initiale, il y a, après cinq minutes, passage à 165 p. 100 du nombre de résistants et, après dix minutes, nous en trouvons 217,9 p. 100. Rappelons que dans le même milieu, mais sans cystéine, le T3 passait après dix minutes à 253 p. 100 par rapport aux 100 p. 100 du départ.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° La résistance aux radiations ultra-violettes du bactériophage φ N intracellulaire n'augmente pas en milieu nutritif pauvre en phosphates.

2° L'addition au même milieu nutritif de phosphore inorganique sous forme d'orthophosphate bisodique ou bipotassique ou de pyrophosphate détermine, dans les mêmes conditions, une augmentation de la résistance.

3° Un effet analogue peut être obtenu par addition au milieu nutritif de phosphore organique sous forme de β glycérophosphate de sodium.

4° La réaction en présence d'orthophosphate est inhibée en milieu chloruré sodique hypertonique. Elle est également inhibée par les ions Mg^{++} et Be^{++} .

5° La réaction en présence de β glycérophosphate est inhibée par les ions Mg^{++} et par la cystéine.

6° La résistance aux radiations ultra-violettes des bactériophages intracellulaires T1, T3 et T7, en milieu nutritif pauvre en phosphates, augmente.

7° Dans les mêmes conditions, la résistance des bactériophages intracellulaires T2, T4 et T6 n'augmente pas. Celle du bactériophage intracellulaire T5 augmente légèrement.

Je désire remercier le Dr J. Molron, assistant du service, ainsi que MM. Ch. Cornil et M. Fort, pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LURIA et LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.
- [2] BENZER. *Viruses*, 1950, 136.
- [3] LATARJET. *J. Gen. Physiol.*, 1948, **31**, 529.
- [4] MUTSAARS. *Ces Annales*, 1950, **80**, 65.
- [5] MUTSAARS. *Ces Annales*, 1950, **80**, 343.
- [6] PAGEt et VIT TU. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 216.
- [7] DUBOIS. *Science*, 1949 **110**, 420.
- [8] MUTSAARS. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1435.
- [9] COHEN. *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 295.
- [10] KOZLOFF et PUTNAM. *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 229.
- [11] LABAW. *J. Bact.*, 1951, **62**, 169.

ÉTUDE DE L'INTRADERMO-RÉACTION AUX SUSPENSIONS DE TRÉPONÈMES FORMOLÉES (SOUCHE NICHOLS PATHOGÈNE) CHEZ LES SYPHILITIQUES ET LES SUJETS NORMAUX

par J. THIVOLET, A. SIMERAY, M. ROLLAND et F. CHALLUT (*).

*(Laboratoire d'Hygiène [professeur SOHIER]
et Clinique Dermatologique et Syphiliographique [professeur GATÉ]
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.)*

Au cours de l'évolution de la syphilis, l'organisme acquiert des propriétés réactionnelles nouvelles qui modifient l'aspect des lésions. L'exemple le plus frappant en est donné par la gomme syphilitique, véritable phénomène de Koch où la rareté des tréponèmes contraste avec les lésions importantes et destructrices.

Si l'on admet qu'il s'agit bien d'une hypersensibilité spécifique conditionnant de telles réactions, on doit pouvoir les reproduire par injection intradermique d'antigènes spécifiques.

Cependant, les nombreux essais entrepris dans ce sens n'ont pas fourni les résultats escomptés. La solution du problème paraît résider, en effet, dans la spécificité de l'antigène employé et l'étude rapide de l'historique de la question montre bien les tentatives variées dirigées vers ce but.

Actuellement, il semble que nous possédions un antigène répondant aux conditions de spécificité et de sensibilité exigées. C'est avec cette suspension de tréponèmes préparée selon la technique de Eagle, Nelson et Magnuson [1, 2, 3] que nous avons repris l'étude de l'intradémo-réaction dans la syphilis. Nous nous contenterons d'exposer brièvement les résultats déjà obtenus, dont on trouvera une mise au point plus complète dans la thèse de l'un de nous (1).

I. — APERÇU HISTORIQUE.

Depuis le début de ce siècle, l'étude de la sensibilité cutanée des syphilitiques a suscité de nombreux travaux que nous allons brièvement résumer. Une étude critique de ces différentes tenta-

(*) Société Française de Microbiologie, Séance du 5 février 1953.

(1) A paraître en 1953.

tives a été faite par Gastinel [4] à la lumière de ses recherches personnelles dans son ouvrage sur la syphilis expérimentale.

1^o Après les premiers essais infructueux de Jadassohn en 1906, Nicolas, Favre, Gautier et Charlet [5] réalisent un extrait de foie de fœtus hérédo-syphilitique qui fut le point de départ de plusieurs expérimentations. Ils attirent l'attention sur trois points essentiels : l'importance primordiale de la spécificité du produit employé, la non concordance de la réaction à la « syphiline » et des réactions sérologiques, la constance de sa positivité dans la syphilis tertiaire.

2^o En 1911, Noguchi [6] prépare un extrait de ses cultures de tréponèmes. Très largement utilisée pour tester l'allergie cutanée, cette « luétine » se révéla bientôt moins spécifique qu'on aurait pu le croire, et Burnier [7] dans une étude critique très complète conclut à la faillite du test à la luétine, qui fut d'ailleurs complètement abandonné par la suite.

3^o La théorie de l'hétéro-allergie lancée par Dujardin [8] en 1927 devait orienter les recherches dans une voie toute différente. Selon cet auteur, à côté de l'allergie spécifique il se développe au cours de la syphilis des hypersensibilités non spécifiques que l'on peut extérioriser par des antigènes variés, tels que le sérum de cheval, la gélose, la tuberculine, etc. Malgré quelques constatations troublantes, ces antigènes ne peuvent servir en pratique à déceler une hypersensibilisation spécifique, comme Sézary et Cometou [9] l'ont démontré.

4^o On en revint donc aux luétines organiques, qui d'ailleurs n'avaient pas été complètement abandonnées. La luétine de Muller et Brandt (1927) et la luétine de Kolmer (1930) préparées à partir de syphilomes testiculaires de lapins donnèrent lieu à de nombreux travaux, surtout étrangers. La seule expérimentation française fut celle de Degos (1941) [10] qui obtint des résultats très intéressants et sensiblement comparables à ceux des premiers auteurs. Enfin, en 1948, Eagle, Nelson et Magnuson mettent au point une technique de purification de leur émulsion de tréponèmes qui fut utilisée en 1951 par Marshak et Rothmann [11] pour l'étude de l'allergie cutanée. Leur statistique, pourtant modeste, montre que la réaction est négative chez les sujets sains (6 cas) et dans la syphilis secondaire (6 cas), alors qu'elle est constamment positive dans la syphilis tertiaire cutanée (3 cas). Dans les diverses formes de syphilis nerveuses ainsi que dans les syphilis congénitales, les résultats sont trop peu nombreux pour pouvoir tirer une conclusion.

II. — PRÉPARATION DE LA SUSPENSION PURIFIÉE.

Nous avons suivi la technique de Eagle, Nelson et Magnuson employée par Marshak et Rothmann, à laquelle nous avons fait

subir quelques légères modifications. En voici les différentes étapes :

1^o *Prélèvement.* — Les testicules de lapins inoculés avec la souche Nichols, pathogène et adaptée à cet animal, sont prélevés aseptiquement, découpés en tranches minces et lavés au sérum physiologique.

2^o *Extraction.* — Ils sont ensuite placés dans un récipient stérile avec 10 ml de sérum physiologique, et agités pendant deux heures à l'agitateur de Kahn de façon à provoquer la diffusion des tréponèmes dans le milieu liquide. Après décantation, l'émulsion brute ainsi obtenue contient 50 à 100 tréponèmes par champ à l'ultra-microscope (objectif n° 6, oculaire n° 6) suivant la richesse de l'orchite.

3^o *Centrifugation.* — Afin d'éliminer les spermatozoïdes, les globules rouges et les débris testiculaires, on centrifuge le liquide pendant dix minutes à 3 000 tours/minute.

4^o *Formolage.* — Après décantation, on ajoute du formol pour une concentration finale de 1 p. 100, afin de tuer et fixer les tréponèmes. La suspension formolée est laissée vingt-quatre heures à la température de +4°.

5^o *Ultra-centrifugation.* — Elle subit alors 3 ultra-centrifugations de trente minutes à 10 000 tours/minute, dans une centrifugeuse angulaire (Serval), séparées chaque fois par une remise en suspension du culot en sérum physiologique afin de débarrasser les tréponèmes de l'excès de formol.

6^o *Remise en suspension.* — Ce culot est remis en suspension homogène dans 10 ml de sérum physiologique formolé à 0,5 p. 1 000 au moyen du broyeur de Durel (trente secondes à 18 000 tours/minute). Nous faisons suivre ce temps d'une légère centrifugation de dix minutes à 2 000 tours/minute pour séparer les particules non émulsionnées.

7^o *Vérification finale et répartition en ampoules.* — Un contrôle de stérilité est pratiqué par ensemencement sur bouillon ordinaire et milieu hydrosulfite (milieu type Bonnel). L'ultra-microscope montre 20 à 40 tréponèmes par champ, bien conservés mais moins brillants qu'à l'état vivant. Le chiffre moyen correspond environ à 100 000 tréponèmes par millimètre cube. La suspension purifiée de tréponèmes se conserve facilement en ampoules scellées au réfrigérateur à +4°.

Afin de pouvoir comparer les résultats, il conviendrait d'effectuer un dosage rigoureux de la suspension. La numération des tréponèmes est une méthode approximative susceptible d'erreurs (lyse des tréponèmes). La comparaison des résultats obtenus chez un même malade avec des suspensions de concentrations différentes nous montre que l'intensité de la réaction semble grossièrement proportionnelle à la concentration des tréponèmes.

Chaque fois que nous avons employé une émulsion nouvelle, nous en avons évalué l'activité, d'une part chez des malades déjà testés, d'autre part chez des sujets témoins. Enfin, le dosage de l'activité anti-complémentaire de la suspension nous donnera peut-être une méthode plus précise.

Cette méthode est légèrement différente de celle qu'ont préconisée Marshak et Rothmann. Nous avons en effet substitué à l'agitation lente telle qu'elle est utilisée pour l'obtention de l'émulsion utilisée dans le test de Nelson, une agitation rapide à l'agitateur de Kahn comme celle que, à la suite de Borel [12], nous employons pour obtenir de riches inoculum de tréponèmes. De cette façon les suspensions de tréponèmes sont plus concentrées, sans être beaucoup plus chargées de débris tissulaires. Ce souci d'obtenir une émulsion riche nous a amenés aussi à supprimer la filtration et à nous contenter d'une centrifugation à 3 000 tours pour éliminer les globules rouges et les débris variés. Nous croyons d'ailleurs qu'une purification sévère portant sur les grosses particules est assez illusoire puisqu'il est impossible de se débarrasser des substances solubles. Comme on le verra, la spécificité de notre suspension de tréponèmes ne semble pas avoir été affectée par cette modification.

III. — TECHNIQUE DU TEST. ASPECT DE LA RÉACTION.

L'intradermo-réaction est effectuée dans la région deltoïdienne par injection de 0,2 ml. Une réaction de contrôle est faite en se servant d'un extrait de testicule de lapin sain traité dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites.

On peut observer, dans les quarante-huit premières heures, un érythème sans infiltrat qui disparaît toujours au troisième jour, aussi avons-nous pris l'habitude de lire nos intradermo-réactions quatre jours après les avoir pratiquées. A ce moment, une réaction négative n'est jamais douteuse, tout au plus pourrait-il exister une très légère tache purpurique. On saura qu'une réaction positive persiste toujours plus de huit jours.

Du côté de la réaction témoin, nous n'avons eu que des résultats négatifs, aussi bien chez les sujets sains que chez les syphilitiques.

En cas de réaction positive, il existe au point d'injection une papule érythémateuse, de diamètre variable (3 à 30 mm) souvent entourée d'une aréole érythémateuse et pouvant quelquefois devenir vésiculeuse ou même nécrotique. Maximum au quatrième jour, l'infiltration est toujours perceptible au huitième jour et ne disparaît quelquefois qu'au bout de trois semaines. Il nous semble que la durée de la réaction est au moins aussi importante que son intensité, ces deux facteurs étant indépendants l'un de l'autre.

Nous employons l'échelle de notation suivante empruntée à Degos, à laquelle nous avons ajouté la taille approximative de la papule.

++++ lorsque papule de plus de 20 mm de diamètre avec aréole et vésiculation.

+++ papule nettement infiltrée de plus de 10 mm de diamètre avec aréole.

++ papule nettement infiltrée de 5 à 10 mm de diamètre sans aréole.

+ petite papule légèrement infiltrée de 3 à 5 mm de diamètre.

De plus, lorsque cela est possible, nous suivons l'évolution de la réaction.

L'examen anatomo-pathologique (professeur agrégé Coudert) d'une papule prélevée à la quarante-huitième heure montre, sous un épiderme normal, une forte réaction de type histio-mono-cyttaire siégeant autour des vaisseaux dont l'endothélium est tuméfié de telle sorte que parfois la lumière est effacée. Il s'agit donc d'une image typique d'allergie et non celle d'une inflammation banale (fig. 1 et 2).

Ces lésions d'endo-vascularites, que ne signalent pas Marshak et Rothmann, font comprendre la possibilité de vésiculation ou de nécrose, étapes différentes d'un même processus en rapport avec l'aptitude réactionnelle plus ou moins grande des malades et aussi, chez un même malade avec la concentration plus ou moins forte de l'émulsion, comme le montrent plusieurs de nos observations.

IV. — RÉSULTATS OBTENUS.

Depuis 1951, dans des recherches poursuivies parallèlement à celles du test de Nelson, nous avons étudié la sensibilité cutanée de l'émulsion de tréponèmes d'une part chez l'homme, principalement à la Clinique Dermatologique et Syphiligraphique de l'Antiquaille (professeur Gaté), d'autre part chez le lapin syphilisé, au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine (professeur Sohier).

1^o RÉSULTATS CHEZ L'HOMME. — Notre statistique actuelle porte sur 202 cas dont 74 sujets témoins. Nous la résumons dans le tableau suivant :

2^o RÉSULTATS DE L'EXPÉRIMENTATION CHEZ L'ANIMAL. — Chez le lapin syphilisé, les résultats sont moins nets et comparables à ceux de Marshak et Rothmann.

Sur 14 lapins inoculés depuis une période allant de un à dix mois, 4 présentèrent des intra-dermo-réactions positives à la suspension de tréponèmes (inoculés respectivement depuis dix,



FIG. 1. — Papule prélevée à la quarante-huitième heure. Epiderme normal. Réaction histiomonocytaire péri-vasculaire.

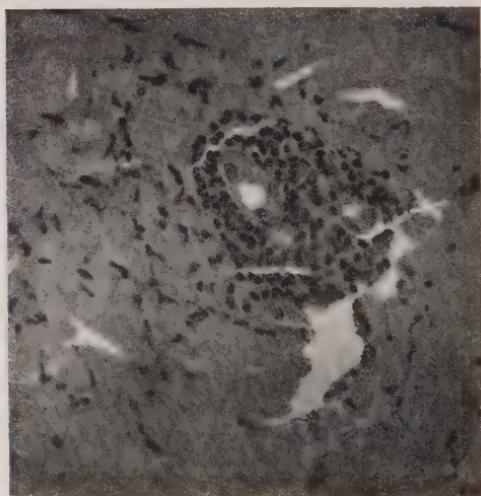


FIG. 2. — Détail de la coupe précédente.
Noter la réaction de l'endothélium du vaisseau et l'infiltrat qui l'entoure.

	NOMBRE de cas	INTRADERMO +	INTRADERMO -
Syphilis primaires	7	0	7
Syphilis secondaires	8	4	7
Syphilis tertiaires	19	19	0
Syphilis congénitales	10	5	5
Syphilis nerveuses	13	8	5
Syphilis latentes	14	8	6
Sérologie irréductible	19	14	5
Syphilis anciennes traitées à B.-W. négatif	38	15	23
Non syphilitiques	74	0	74
Total	202		

trois et deux mois). Pourtant l'infection avait suivi son cours normal comme le prouvent les réactions de Nelson effectuées dans le sérum et quelquefois dans le liquide céphalo-rachidien.

Cette discordance ne doit cependant pas nous étonner, elle montre simplement que l'aptitude réactionnelle de la peau de l'animal n'est pas identique à celle de l'homme. Les réactions tuberculiniques du lapin nous en donnent d'ailleurs un exemple. D'autre part, la syphilis expérimentale du lapin est loin d'être comparable à la syphilis humaine.

V. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. DÉDUCTIONS.

Les résultats obtenus chez l'homme sont encore trop peu nombreux pour pouvoir en tirer des conclusions définitives. Certains points méritent cependant d'être retenus.

1^o *La spécificité de la réaction est, jusqu'ici, absolue.* — Tous les témoins, dont la plupart présentèrent des affections dermatologiques variées ont été négatifs. Une observation nous paraît intéressante :

Obs. XVI. — *M. M..., 57 ans. Service du professeur Gaté* : Pyodermité végétante de Hallopeau, chez un malade polyallergique. Intradermo-réactions à la levure, à la tuberculine, au vaccin antistaphylococcique et au sérum de cheval, phlycténulaires et nécrotiques.

IDTr et IT (2) négatives.

Inversement, la suspension de tréponèmes n'agit pas en tant qu'allergène banal sur l'organisme hypersensibilisé du syphilitique tertiaire comme le veut la théorie des hétéro-allergies.

Obs. CXXXI. — *M. R..., 40 ans. Service du professeur Gaté* : Syphilis tertiaire ulcéro-cicatricielle. Sérologie positive. IDTr positive. Papule

(2) Lire désormais pour IDTr : intradermo-réaction à la suspension de tréponèmes, et pour IT : intradermo-réaction à la suspension témoin.

de 10 mm de diamètre, aréole érythémateuse de 15 min persistant plus de trois semaines.

Intradérmico-réactions à la suspension témoin, au Dmelcos, au vaccin antistaphylococcique, et au sérum de cheval, négatives.

2° Il n'y a pas de parallélisme entre les réactions sérologiques test de Nelson y compris, et les résultats donnés par IDTr.

Des syphilis à sérologie et test de Nelson positifs peuvent avoir des intradermo-réactions négatives (obs. II, XLI, CLVIII). Inversement chez des sujets à sérologie classique et test de Nelson négatif, on peut voir persister l'allergie cutanée spécifique (obs. XVII, XLII, LXI, LXXII, LXXXVIII, CXXX, CXLIII). Dans ces cas l'allergie cutanée à la suspension de tréponèmes s'est même développée après la négativation de la sérologie et du test de Nelson :

Obs. VC. — *M. B..., 22 ans. Service du professeur Gaté* : Syphilis primaire en juillet 1952. Sérologie positive. IDTr négative. Négativation de la sérologie classique en septembre 1952. En août 1952, test de Nelson négatif, IDTr fortement positive. Papule très saillante de 5 mm de diamètre persistant plus de quinze jours.

Ces divergences qu'avaient déjà notées Nicolas, et plus tard Degos, au sujet de la sérologie classique, se retrouvent naturellement pour le test de Nelson. Loin de s'opposer, l'IDTr et la réaction d'immobilisation des tréponèmes peuvent peut-être se compléter, la première extériorisant l'allergie tissulaire, la seconde les anticorps circulants, mais elles ne paraissent pas pouvoir se substituer l'une à l'autre, comme certains l'ont prétendu récemment [13].

3° L'IDTr a été négative dans la syphilis primaire, rarement positive dans la syphilis secondaire.

a) *Syphilis primaire*. — Dans 7 cas de syphilis primaire, dont 5 présentaient une sérologie positive, l'intradérmico-réaction a été négative. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par la majorité des travaux antérieurs.

b) *Syphilis secondaire*. — Sur 8 cas de syphilis secondaire, un seul a présenté une intradermo-réaction très positive, alors que les 7 autres furent totalement négatifs.

Obs. XXX. — *M. B..., 30 ans. Service du professeur Gaté* : Syphilis secondaire cliniquement maligne. Sérologie positive. Test de Nelson négatif. IDTr positive (papule infiltrée de 4 mm de diamètre avec vésiculation), disparition au quinzième jour. Intradérmico-réaction au Dmelcos, au vaccin antistaphylococcique et au sérum de cheval négatives.

Si la positivité de la sérologie classique interdit de ranger cette syphilis secondaire dans le cadre de la syphilis maligne, elle s'en

rapproché cependant du point de vue clinique et peut-être aussi par la négativité du test de Nelson. Or, la présence d'une intradermo-réaction positive à la « luétine » a été signalée plusieurs fois dans des cas de syphilis maligne, il n'est donc pas interdit de penser que, loin d'être une syphilis anallergique, la syphilis secondaire maligne traduirait plutôt une hypersensibilité précoce, hypersensibilité spécifique comme nous le montrent les résultats négatifs des autres intradermo-réactions.

4° *L'IDTr à la suspension de tréponèmes a été positive dans tous les cas de syphilis tertiaire :*

a) *Syphilis tertiaire cutanéo-muqueuse.* — Treizième cas. Nous ne faisons que confirmer les résultats déjà obtenus en particulier par Degos (34 cas) et par Marshak et Rothmann (3 cas). Si l'intérêt de cette réaction paraissait capital dans la syphilis tertiaire cutanéo-muqueuse où la sérologie classique peut se montrer négative, il l'est moins maintenant depuis la vulgarisation du test de Nelson. Cependant, elle nous a permis, dans plusieurs cas, de faire simplement et rapidement la preuve de la nature syphilitique de lésions suspectes (obs. XXVI et CXXXI déjà citées). Inversement, elle a pu éliminer la syphilis dans des lésions qui, cliniquement, pouvaient y faire penser (obs. XIII et L).

Obs. L. — M. G... Service du professeur Gaté : Lésion ulcèreuse et circinée de la jambe droite, d'aspect syphiloïde. Sérologie négative. IDTr négative. Traitement d'épreuve inefficace. Test de Nelson négatif.

b) *Ostéo-périostite syphilitique.* — Un cas. L'intérêt de l'intradérmico-réaction est peut-être plus évident dans cette observation où il existe une dissociation de la sérologie classique.

Obs. C.X. — M. G..., 36 ans. Service de Dermato-Vénérologie de l'hôpital Desgenettes (commandant Olivier) : Ostéo-périostite syphilitique des diaphyses tibio-péronières vérifiées radiologiquement. Debains négatif, Kolmer positif, Kahn négatif. Kline légèrement positif. Test de Nelson positif. IDTr fortement positive. Papule de 5 mm de diamètre avec aréole érythémateuse de 10 mm.

c) *Syphilis cardio-vasculaires.* — Cinq cas. Dans 5 aortites syphilitiques à sérologie positive, l'intradérmico-réaction a été constamment positive, le plus souvent d'une façon intense.

5° *Dans les autres formes de syphilis, les résultats sont ou discordants ou trop peu nombreux pour pouvoir en tirer une conclusion. Ils demandent cependant quelques considérations.*

a) *Syphilis congénitales.* — Sur 10 syphilis congénitales tardives, la moitié est à retenir. Dans 5 cas, en effet, ce diagnostic de prudence a été porté chez des enfants issus de parents syphilitiques, mais la sérologie et l'examen clinique ont toujours été négatifs. Dans l'autre moitié, au contraire, une sérologie positive

et des stigmates sérieux donnent la certitude du diagnostic. L'IDTr a été négative chez les premiers et positive chez les seconds (obs. XV, XXIV, XLVII, LXVI, XCVII). Si l'on assimile la syphilis congénitale tardive à la syphilis tertiaire de l'adulte, ces résultats, bien que contraires à ceux de Degos, ne doivent pas nous étonner. Une statistique plus importante est cependant nécessaire pour pouvoir l'affirmer.

b) *Syphilis nerveuses.* — La rareté des paralysies générales non traitées ne nous a pas encore permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle, anallergique avant le traitement, la paralysie générale deviendrait allergique après impaludation. Nos 4 malades déjà traités ont tous réagi à la suspension de tréponèmes ; il resterait donc à démontrer, comme l'a fait Degos, que l'intradérmoréaction est négative avant le traitement.

Dans 7 cas de tabès, nous avons obtenu 4 intradermo-réactions positives et 3 négatives, sans qu'il soit encore possible d'établir une relation quelconque entre les données de l'intradérmoréaction et celles de la sérologie, du test de Nelson, de l'évolution ou du traitement.

Enfin, l'intradérmoréaction a été négative dans 2 cas d'atrophie optique probablement d'origine syphilitique.

c) *Sérologies irréductibles.* — Sur 19 cas de sérologie irréductible, 5 furent négatifs à l'intradérmoréaction. Faut-il donner à cette anergie une valeur pronostique et ces 5 syphilitiques seront-ils susceptibles de présenter par la suite des accidents nerveux, comme le pensent Gougerot et Peyre [14] ?

d) *Syphilis latentes.* — Chez 14 malades chez qui la syphilis fut découverte soit par l'interrogatoire, soit par l'examen sérologique, nous avons obtenu 8 résultats positifs et 6 négatifs. Dans ces 6 cas, le test de Nelson positif écartait la possibilité d'une fausse réaction sérologique. Comme corollaire de ce que nous avons observé dans la syphilis primo-secondaire, peut-on penser qu'il s'agit dans ces 6 cas de syphilis secondaire latente et dans les 8 autres de syphilis tertiaire latente ?

L'intradérmoréaction permettrait-elle le diagnostic des syphilis tertiaires latentes à sérologie négative ? Une de nos observations semble le prouver.

Obs. CII. — M. H..., 44 ans. Service du professeur Gaté : Eczéma. Sérologie totalement négative.

Malade pris comme témoin. Intradérmoréaction fortement positive. Réaction papuleuse de 8 mm de diamètre entourée d'une aréole érythémateuse de 15 mm, persistant plus de deux semaines.

A l'interrogatoire, syphilis secondaire très mal traitée en 1937. Test de Nelson anti-complémentaire à deux reprises. Malade perdu de vue.

e) *Syphilis anciennes traitées, à sérologie négative.* — Dans 38 syphilis plus ou moins anciennes, traitées régulièrement, à

sérologie classique totalement négative, on compte 15 intradermo-réactions positives et 23 négatives.

Mais si l'on considère uniquement les 18 cas dans lesquels un test de Nelson a été pratiqué, on obtient les résultats suivants :

	NELSON +	NELSON —
Intradermo +	9	6
Intradermo —	9	0

Ainsi, dans une syphilis ancienne traitée, à sérologie classique négative, une intradermo-réaction négative correspondrait à un test de Nelson négatif, mais une intradermo positive ne veut pas dire que le test de Nelson soit obligatoirement positif. On conçoit l'intérêt pratique de cette réaction si elle se trouvait vérifiée, car on posséderait ainsi le moyen de poser un diagnostic rétrospectif de syphilis chez des malades à sérologie classique et à test de Nelson négatif.

CONCLUSIONS.

Il semble que nous possédions actuellement une méthode suffisamment sensible et spécifique pour tester l'allergie cutanée dans la syphilis.

Les travaux ultérieurs devront fixer la part de cette allergie dans les différentes formes de la syphilis.

Si cette étude ne peut encore aboutir à des conclusions précises, elle soulève cependant plusieurs hypothèses d'une grande importance pratique ou théorique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. EAGLE et R. FLEISCHMANN. *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 369.
- [2] NELSON. *Am. J. Hyg.*, 1948, **48**, 120.
- [3] H. G. MAGNUSON, H. EAGLE et R. FLEISCHMANN. *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1948, **32**, 1.
- [4] GASTINEL et PULVENIS. *La syphilis expérimentale*. Masson, 1934, 210-223.
- [5] NICOLAS, FAVRE, GAUTIER et CHARLET. *Lyon Médical*, 1910, **114**, 621.
- [6] H. NOGUCHI. *J. exp. Med.*, 1911, **14**, 557.
- [7] BURNIER. *Ann. Mal. Vénér.*, janvier 1914, 1.
- [8] DUJARDIN. *Ann. Mal. Vénér.*, avril 1932, 259.
- [9] SÉZARY et COMETOU. *Ann. Derm. Syph.*, 1930, **11**, 1138.
- [10] DEGOS. *Bull. Soc. Franç. Derm. Syph.*, 1941, **48**, 376-388.
- [11] MARSHAK et ROTHMANN. *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1951, **35**, 35-41.
- [12] BOREL. *Soc. Biol.*, janvier 1952.
- [13] LAVERGNE. *G. M. de France*, 1952, **59**, 278.
- [14] GOUGEROT et PEYRE. *Monde Médical*, 1^{er} décembre 1927, 969.

ÉTUDES SUR LE TRANSFERT A DES LAPINS NEUFS DE LA CAPACITÉ DE PRODUCTION D'ANTICORPS PAR DES FRAGMENTS DE RATE D'ANIMAUX IMMUNISÉS

par ASTRID FAGRAEUS et PIERRE GRABAR.

(*Service de Chimie microbienne de l'Institut Pasteur, Paris
et Statens Bakteriologiska Laboratorium, Stockholm.*)

En 1899, Deutsch [1] a constaté que des fragments de rates de cobayes immunisés, inoculés à des animaux neufs, font apparaître dans le sérum de ces derniers un faible titre d'agglutination. Ce fait a été confirmé par Luckhardt et Becht sur des chiens [2] et par Topley sur des lapins [3]. Ces études ayant été faites sur un très petit nombre de lapins, il nous a paru nécessaire de préciser, par des études plus détaillées et portant sur un nombre d'animaux plus élevé, cette propriété des fragments de rate, car cette méthode peut rendre des services appréciables dans diverses recherches immunologiques. Dans ce qui suit, nous décrivons les résultats de ces études qui comportent l'établissement de courbes d'apparition et de développement du titre en anticorps dans le sérum des animaux inoculés avec des suspensions de fragments de rates de lapins immunisés et leur comparaison avec les courbes des lapins immunisés directement. Nous avons été amenés à étudier également la persistance d'antigènes microbiens dans le tissu splénique dans les mêmes conditions expérimentales afin d'exclure la possibilité d'une immunisation directe par les antigènes présents éventuellement dans les fragments de rate transférés. Une étude histologique des fragments fixés dans le péritoine des animaux injectés nous a permis de faire quelques observations sur leur sort. Cette méthode a déjà permis à l'un de nous d'entreprendre une étude sur le rôle de la cortisone dans la formation des anticorps [4].

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Deux catégories de lapins ont été utilisées. Dans la première, dites des « donneurs » de rate, on employait des lapins plus gros, pesant 2,5 à 3 kg, tandis que dans la deuxième série que nous désignerons par « receveurs », les animaux étaient plus petits,

2,2 à 2,5 kg. Dans la plupart des expériences on a utilisé des lapins préalablement immunisés et recevant une injection de rappel au début de l'expérience, technique déjà utilisée par l'un de nous [5], et qui a montré, surtout lorsqu'on injecte des microbes vivants, que la formation d'anticorps dans la rate (études *in vitro*) est maximale vers le quatrième jour après l'injection de rappel.

Comme *antigène*, nous avons utilisé des suspensions H de *Salmonella typhosum* (souche I. S. 57) cultivées et récoltées par la méthode de Gard pour développer la phase de H [6]; la concentration employée était de 10^8 - 10^9 de bactéries/ml (vivantes ou tuées par le formol). Nous avons choisi la mesure des titres en anticorps H, car ces titres sont assez élevés, ce qui permet des comparaisons plus significatives.

Les *anticorps H* ont été dosés en utilisant des dilutions progressives (facteur 2) des sérums. Leur titre a été exprimé en log décimal du dénominateur de la dernière dilution du sérum donnant une réaction positive avec la suspension microbienne H (ainsi une dilution 1/100 donne un titre de 2).

Les *suspensions de fragments de rate* ont été préparées de la manière suivante. La rate, après avoir été pesée, a été d'abord coupée en petits morceaux (150-300) qui ont été ensuite broyés dans un « broyeur de Borrel ». Les fragments ainsi obtenus, dont les plus volumineux pesaient, à l'état humide, jusqu'à 2 mg (et les plus petits moins de 0,2 mg) ont été mis en suspension en solution physiologique. Cette suspension contenait aussi des cellules isolées. Lorsque le broyat d'une ou de plusieurs rates devait être inoculé à plusieurs lapins, on partageait d'abord la (ou les) rate en parties égales (en poids) et les broyats de ces mélanges ont été utilisés.

Dans des expériences de contrôle, les broyats de rate ont été d'abord suspendus dans l'eau distillée froide dans le but de lyser les cellules; ces suspensions ont été ensuite additionnées de sel afin de les rendre isotoniques avant leur injection aux lapins témoins.

Les *expériences* ont été faites comme suit : des lapins neufs ou déjà immunisés recevaient par voie veineuse, 10^8 microbes vivants ou 10^9 microbes tués par kilogramme d'animal. Ces lapins, que nous appelons « donneurs » de rates, ont été sacrifiés à des temps variant de vingt-quatre heures à quatre jours après cette injection et leurs rates servaient à la préparation des broyats décrits ci-dessus. Ces suspensions ont été inoculées par voie intrapéritonéale à des lapins neufs que nous désignons par « receveurs ». Les inoculations ont été faites (à l'exception de quelques cas dont nous parlerons plus bas) en utilisant des aiguilles assez grosses et émoussées et en plaçant les lapins dans

la position de Trendelenburg afin d'éviter l'injection dans l'intestin.

Dans la série d'expériences faites pour étudier la persistance de l'antigène dans la rate, les prélèvements de cet organe ont été faits chez des lapins non immunisés ayant reçu des injections de microbes six, douze, dix-huit, vingt-quatre et quarante-huit heures auparavant.

Des prélèvements de sang, faits dans la veine marginale de l'oreille, ont servi pour le dosage des agglutinines.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1^o APPARITION ET TAUX DES AGGLUTININES. — La figure 1 montre l'évolution caractéristique du titre des agglutinines chez deux

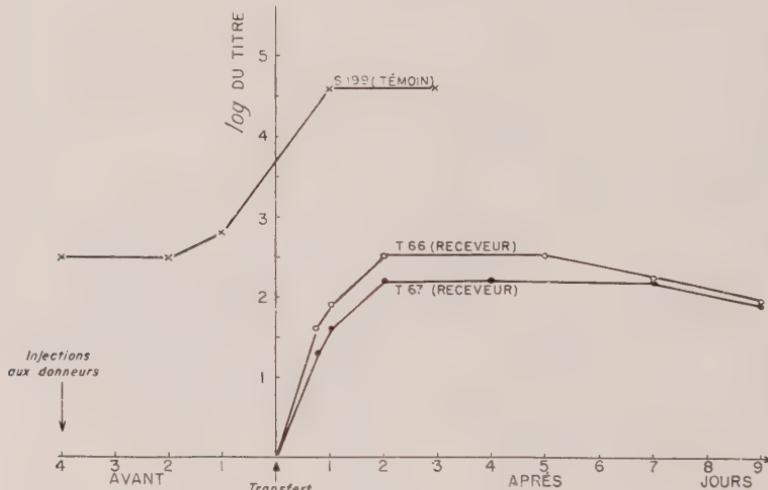


FIG. 1.

lapins ayant reçu une inoculation d'une suspension de rate d'un donneur injecté quatre jours auparavant. On voit que déjà, dix-huit heures après l'inoculation des fragments de rate, le sérum du receveur contient des anticorps et que le titre croît pendant les premières quarante-huit heures et atteint un plateau. Lorsqu'on compare ces résultats aux titres que l'on observe chez un lapin (S. 199, fig. 1) recevant une injection de rappel comme les lapins donneurs, on voit que l'augmentation des anticorps se fait parallèlement dans les deux cas.

Si, au lieu d'inoculer aux lapins receveurs des suspensions de fragments de rate contenant des cellules entières, on injecte des suspensions de cellules lysées par l'eau distillée, on ne peut pas

TABLEAU I.

Expérience	Donneur n°	Antigène injecté: type et quantité	Temps du transfert: jours après la vaccination	Poids de rates, en grammes, en transférées	Receveurs n°	Logarithmes des titres en agglutinines du serum des receveurs. Jours après le transfert									
						18h	24h	2	3	4 - 5	6 - 7	8 - 9	10-11	13	16
1	S 539	I.S. 57 viv. 10 ⁶	4	1	T 66	1,6	1,0	2,5	2,5	2,5	2,2	1,9		1,6	1,3
			4	1,2	T 66		0	0	0	0	0	0		1,6	1,6
2	S 360	idem	4	1,1	T 67	1,3	1,6	2,2	2,2	2,2	2,2	1,9		1,3	1,0
			4	1,1	T 70		0	0	0	0	0	0		0	0
3	S 405	idem	4	1,5	T 151	0	0								
	S 404		4	1,8	T 182	0									
4	S 547	Typh. H tuées 10 ⁹	4	0,5	T 229	1,0	1,2			1,6	1,6				
	"		4	0,5	T 232	0	0			0	0				
5	S 384		2	1,7	T 141	0		2,5			2,5			2,5	
	S 385	idem	2	1,7											
	S 386														
6	P 795	idem	2	1,3	P 799	0	1,0			1,3	1,4	1,6	1,4		
7	P 798	idem	2	1,4	P 800	0	1,0			1,9	2,2	2,5	2,5		
8	S 444		1	2,3	T 154	0				1,7	1,9	2,5			
	S 445	idem	1	2,3	T 151	0				2,2	2,5	2,5			
9	S 448		1	2,6	T 155	0				1,9	2,2	2,2			
	S 450	idem	1	2,6											
	S 451														
10	S 429		1	1,2	T 147	0				0	0				
	S 418	idem	1	1,2	T 148	0				0	0				

*) Suspension de rate traitée à l'eau distillée

mettre d'anticorps en évidence dans le sérum de ces receveurs (lapins n°s T 70, T 132, T 232, tableau I). Dans un cas (T 68) on a pu constater leur présence, mais seulement le neuvième jour après l'inoculation, ce qui est certainement dû à la présence d'antigène dans la suspension injectée ; or, dans ce cas, le donneur était vacciné avec des bactéries vivantes. Par contre, chez le lapin qui recevait la même suspension, mais non lysée, on a observé une rapide apparition d'anticorps (lapin n° T 66).

Dans les expériences n°s 5 à 10 (tableau I), les rates ont été prélevées à des temps plus courts, un et deux jours après l'injection du vaccin. On voit que l'apparition d'anticorps chez les receveurs est retardée. Les anticorps apparaissent donc dans la circulation des receveurs d'autant plus vite que le transfert est réalisé plus tardivement après l'injection du vaccin aux donneurs.

Dans l'expérience n° 10, les deux lapins ont reçu la même suspension de rate et aucune apparition d'anticorps n'a été constatée, mais les quantités de rate inoculées ont été plus faibles que dans les expériences analogues (n°s 8 et 9). Dans l'expérience n° 4, le lapin T 229 a présenté un titre en anticorps plus bas que les animaux des expériences n°s 1 et 2 ; or, ce lapin avait reçu moins de suspension de fragments de rate. Ces faits nous ont amenés à exécuter l'expérience suivante pour nous rendre compte si la quantité d'anticorps formés est fonction de la quantité de suspension de rate transférée. Les rates de trois donneurs (S. 540, 541 et 542) ont été prélevées trois jours après l'injection de 10⁹ bactéries tuées ; ces organes ont été divisés en deux por-

tions inégales (4,2 et 1,0 g) qui ont été traitées comme précédemment et inoculées à deux lapins receveurs (T 236 et 234) ; les résultats des dosages d'agglutinines apparues chez ces lapins montrent (fig. 2) que chez l'animal qui a reçu plus de fragments de rate on observe un titre plus élevé au cours des premiers jours après l'inoculation.

Plusieurs expériences ont été réalisées en vue de contrôler la

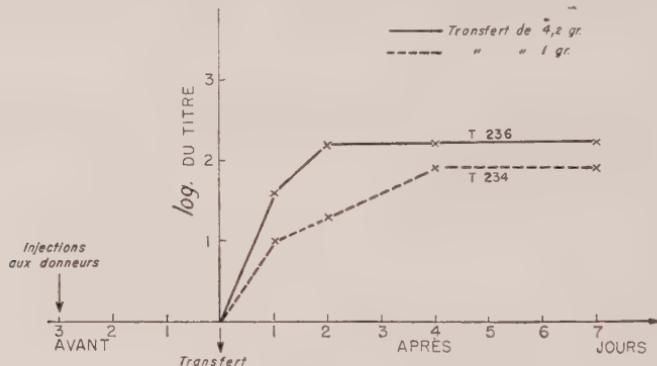


FIG. 2.

TABLEAU II.

Expérience n°	Donneur n°	Antigène injecté type et quantité	Temps du transfert; jours après la vaccination	Poids de rate transférée en gr	Récepteurs n°	Logarithmes des titres en agglutinines du sérum des receveurs. Jours après le transfert							
						1	2	3	4 - 5	7	11	13	
11	S 538	I.S.57.10 ⁸ (bact.viv.)	4	0,7 0,7	T 225	1,6 1,5	1,9 1,4			2,2 1,9	2,2 1,9	1,2 1,5	1,6 1,5
	S 528 537	idem			T 226	1,0 1,0	1,9 1,5	2,2 1,9		2,5 2,2	2,5 1,9	1,6 1,5	2,2 1,5
13	S 542 543	Typh.H.10 ⁹ (bact.tuées)	4	1,0 1,0	T 230	1,6 1,6	2,5 1,9			2,5 2,5	2,5 2,5	2,5 2,2	2,5 2,4
	S 401 S 408 S 411	I.S.57.10 ⁸ (bact.viv.)			T 231	1,6 1,6	1,9 1,9			2,5 2,5	2,5 2,5	2,5 2,2	2,5 2,4
15	S 539	Typh.H.10 ⁹ (bact.tuées)	3	1,0 1,0	T 235	0 1,3	0 1,6			0 1,4	0 1,9	0 1,6	
	S 570 S 575 S 576	idem			T 237	1,2 1,2 1,1	1,9 1,9 1,6						
16	S 570 S 575 S 576	idem	4	1,2 1,2 1,1	T 267	1,9 1,9 1,6							
					T 268								
					T 269								

régularité des résultats. Le tableau II montre que si on inocule à deux receveurs des quantités identiques d'une même suspension de fragments de rate, les titres d'agglutination des sérums de ces receveurs sont ou bien identiques (expériences n°s 13 et 14), ou bien ne diffèrent que d'une dilution, cette légère différence se maintenant d'ailleurs pendant toute la durée de l'expérience. Dans deux cas, lapins T 131 et T 236 (expériences n°s 3 et 15), aucune apparition d'anticorps n'a pu être observée et nous

pensons que dans ce cas l'inoculation a dû pénétrer dans l'intestin, comme dans le cas signalé plus bas, où déjà une heure après l'injection on n'a pas retrouvé le matériel injecté dans le péritoine, ce qui souligne la nécessité d'employer des aiguilles plus grosses que celles utilisées dans ces cas.

2° LOCALISATION DES FRAGMENTS DE RATE DANS LE PÉRITOINE DES RECEVEURS ET LEUR ASPECT MORPHOLOGIQUE. — Dans cette série d'expériences, les lapins receveurs de rate ont été sacrifiés : dix minutes, trois heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures et cinq jours après l'inoculation des suspensions de rate. Les fragments ont été prélevés, fixés dans du formol à 10 p. 100 et servaient pour l'examen histologique. Dans l'expérience n° 16 (tableau II), les rates provenaient de donneurs ayant reçu l'injection de rappel quatre jours auparavant et on a examiné les fragments de rate récupérés dans le péritoine des receveurs et les titres d'agglutination des sérums de ces derniers.

A. Observations macroscopiques. — *Dix minutes* après l'inoculation intrapéritonéale, on peut constater que la majeure partie des fragments flottent librement dans la cavité péritonéale des receveurs. Quelques fragments sont cependant déjà légèrement fixés sur le mésentère, et surtout l'épiploon où ils forment des agrégats de petites dimensions (grain de riz) ; quelques petites pièces ont été trouvées aussi entre les lobes du foie. *Trois heures* après l'inoculation, la tendance des fragments à former des agrégats dans l'épiploon est plus prononcée. Les injections ayant été toujours faites du côté droit, on constate que la plupart des particules sont assemblées en petits paquets dans la partie droite de l'épiploon. Ces paquets, dont un pesait 0,4 g, ne sont que très lâchement fixés sur la paroi de l'épiploon. Mais *vingt-quatre heures* après l'inoculation, ces fragments sont déjà mieux fixés et il est difficile de les détacher de l'épiploon. Les dimensions des agrégats varient ; ils peuvent avoir celles d'un haricot, ou d'un grain de riz, ou même être plus petits. On les trouve parfois attachés au péritoine de la paroi abdominale et, plus rarement, dans d'autres endroits : la surface inférieure du foie, le mésentère, l'intestin. Tous les gros agrégats présentent une nécrose centrale. Dans un cas, un paquet ayant les dimensions d'un quart de rate a été trouvé libre dans le péritoine et était apparemment entièrement nécrotique. Chez les trois lapins sacrifiés *quarante-huit heures* après l'inoculation, on n'a pas détecté de petits fragments libres et les agrégats fixés sur l'épiploon avaient les mêmes dimensions que ceux observés chez les animaux tués vingt-quatre heures après l'inoculation. La partie centrale des agrégats était en nécrose, mais elle était entourée d'une capsule tissulaire rougeâtre et assez épaisse, de l'ordre du dixième du diamètre des fragments. Une capsule identique a été formée également lorsque l'inoculation a été faite avec des fragments lysés par l'eau distillée. L'examen des péritoines de lapins, *cinq jours* après l'inoculation, a montré des images analogues aux précédentes, mais la capsule était plus épaisse et plus rouge. On a constaté une fois la présence, à l'état libre dans le péritoine, d'un

agrégat de dimensions voisines du cinquième d'une rate normale.

Dans un cas, chez un animal tué une heure après l'inoculation, le péritoine ne contenait aucun fragment décelable. La seule explication plausible est que dans ce cas la suspension a été injectée dans l'intestin, l'aiguille employée ayant été trop fine.

B. *Etudes histologiques.* — Les agrégats décrits ci-dessus et provenant, soit de suspensions de cellules vivantes, soit de cellules lysées par l'eau distillée, ont été examinés sur des coupes histologiques.

Dans le cas d'inoculations de *fragments de rate non lysées*, on observe chez les animaux tués *trois heures* après cette inoculation que les agrégats contiennent surtout des cellules vivantes, encastrées dans une masse hyaline (restes d'érythrocytes agglutinés) et dans de la fibrine. On ne voit que peu de globules rouges et les cellules vivantes sont des cellules du système réticulo-endothélial, lymphocytes et plasmocytes. Des caryorrhées à leur stade initial ou même assez nettes sont visibles par endroits. Autour des fragments l'épipoon contient des leucocytes polynucléaires en quantités variables. Les pièces prélevées sur les animaux sacrifiés *vingt-quatre heures* après l'inoculation et attachées à la paroi péritonéale sont déjà plus ou moins complètement nécrosées avec caryorrhéie et caryolyse. Quelques leucocytes sont présents dans les fibres musculaires du tissu environnant. Les fragments fixés sur l'épipoon, bien que présentant également une image de destruction des cellules, contenaient cependant des îlots de cellules en un état presque normal ; c'étaient généralement des éléments réticulo-endothéliaux non différenciés, mais on pouvait y distinguer aussi des lymphocytes et des plasmocytes. La destruction des cellules la moins prononcée a été observée dans le cas des plus petits fragments encastrés dans l'épipoon, qui présentait une inflammation avec des macrophages, quelques leucocytes et peu de plasmocytes. L'image de destruction s'accentue lorsqu'on examine les pièces prélevées *quarante-huit heures* après l'inoculation, surtout dans les agrégats volumineux. On peut cependant encore trouver quelques petits endroits où les cellules ont un aspect normal ; ce sont généralement des cellules réticulo-endothéliales non différenciées, du type monocyte, ainsi que quelques lymphocytes et parfois des plasmocytes. Le reste, de l'ordre de 95 p. 100 au moins du tissu implanté, présente des pycnoses et des caryorrhées des noyaux cellulaires entourés de substance hyaline. Comme précédemment, les plus petits fragments de rate renferment plus de cellules en bon état, mais leur quantité n'excède par 10 p. 100 de la masse du tissu implanté. Autour des masses nécrosées, on observe une capsule de fibrine, sans granulome, et dans l'épipoon des monocytes, des lymphocytes et une certaine quantité de plasmocytes. Lorsqu'on s'adresse aux pièces prélevées *cinq jours* après le transfert des fragments de rate, on constate dans les parties centrales presque exclusivement des phénomènes de caryorrhéie et de caryolyse. Les régions où les cellules sont encore vivantes sont plus rares et plus restreintes ; elles se rencontrent, comme précédemment, surtout dans les petits agrégats fixés sur l'épipoon. La couche de fibrine périphérique est plus organisée et il y a apparition de granulations. L'infiltration de l'épipoon avec des cellules réticulo-endothéliales est nette. On y trouve surtout de nombreux plasmocytes à des stades de maturation différents, avec une nette prédominance des formes adultes.

Dans un cas, nous avons pu observer des accumulations cellulaires non nécrosées dans des petites régions de l'épiploon. Mais il serait difficile de se rendre compte si ces accumulations correspondent à une greffe réussie du tissu splénique en voie de prolifération dans l'épiploon ou à des petits granulomes, c'est-à-dire à une réaction des tissus de l'hôte.

Dans le cas de transferts de *fragments de rate traitées par l'eau distillée*, des pièces ont été prélevées chez les receveurs vingt-quatre à quatre-vingt-seize heures après l'inoculation. L'examen de ces pièces a montré une destruction totale des cellules et la présence à la périphérie d'une couche épaisse de fibrine. Cette couche, après quatre-vingt-seize heures, était organisée en paroi de tissu granuleux riche en fibroblastes, mais avec peu de plasmocytes, tandis que dans l'épiploon environnant on pouvait observer des lymphocytes et aussi quelques plasmocytes.

3^e PERSISTANCE D'ANTIGÈNES MICROBIENS DANS LE TISSU SPLÉNIQUE.

— Deux séries d'expériences ont été réalisées. La première a permis de préciser la quantité de vaccin qu'il faut injecter par voie péritonéale pour provoquer une réponse nette chez des lapins : nous avons trouvé qu'il suffit généralement d'injecter 10^5 bactéries pour obtenir une légère réponse et 10^6 pour une réponse très nette. Dans la deuxième série d'expériences on effectuait des transferts de fragments de rate, lysés ou non par l'eau distillée, en utilisant les mêmes techniques que précédemment.

On sait qu'au moins 1 p. 100 d'une suspension microbienne injectée par voie veineuse peut être retrouvé dans la rate. Dans les expériences décrites dans les paragraphes précédents, nous avons injecté aux lapins « donneurs » des doses de rappel de 10^8 ou 10^9 microbes tués, et par conséquent les rates de ces animaux pouvaient contenir par exemple 10^6 à 10^7 microbes. Si, lors du transfert des fragments de rate, on ne transférait en réalité que des antigènes contenus dans ces fragments, le résultat ne devait pas dépendre de l'état de ces fragments : cellules intactes ou lysées par l'eau distillée. Or, ces résultats montrent (tableau III) que si le transfert est fait six ou douze heures après l'injection du vaccin aux donneurs, le résultat ne dépend pas de l'état des fragments de rate, tandis que si le transfert est fait plus tardivement (vingt-quatre heures après l'injection de rappel) seuls les fragments contenant des cellules intactes provoquent la formation d'anticorps. Cependant, dans un cas (lapin n° T 19, expérience n° 28, tableau III) on a observé l'apparition tardive d'anticorps qui fait penser à une vraie immunisation active par l'antigène présent dans les fragments transférés. Nous croyons donc pouvoir conclure de ces expériences que les antigènes microbiens injectés aux lapins « donneurs » sont très rapidement détruits dans leur organisme et que, par conséquent lorsque le transfert des fragments de rate de ces animaux est effectué plus tardivement que vingt-quatre heures après l'injection de rappel, ces

TABLEAU III.

Expérience n°	Donneurs n°	Quantité d'antigène injectée aux donneurs	Temps de transfert ¹ après la vaccination	Poids de rate transférés en gr	Quantité de bactéries transférées avec la rate (estimation)	Recepteur n°	Logarithmes des titres en agglutinines des receveurs. Jours après le transfert				
							3	4 - 5	6 - 7	8 - 9	10 - 11
17	649 650 651 652 653 654	$20,2 \text{ ml} \times 10^8$	6	4,3 g 4,3	$10,1 \times 10^6$ $10,1 \times 10^6$	T 287 ² T 288 ²	0 0	1,0 1,3	1,0 1,9		1,0 1,6
	655 656 657 658 659 660			2,0 2,0 2,0	$6,8 \times 10^6$ $6,8 \times 10^6$ $6,8 \times 10^6$	T 289 ² T 290 ² T 291 ²	1,0 1,3 0	— 1,3 0	1,6 1,3 0	1,3 1,0 0	
19	T 35 36 37 38	$10,5 \times 10^8$	12	2,2 2,2	$5,3 \times 10^6$ $5,3 \times 10^6$	T 40 T 42 ²	0 1,0	0 1,3	0 0	0 0	
	T 44 45 46 47 48			2,3 2,3	$6,8 \times 10^6$ $6,8 \times 10^6$	T 49 T 50 ²	0 1,0	0 1,0	0 0	0 0	
21	T 61 62 63 64	$10,0 \times 10^8$	12	2,8 2,8	$5,0 \times 10^6$ $5,0 \times 10^6$	T 52 T 54 ²	1,3 0	2,5 1,0	1,9 1,0	— —	
	T 11 13			1,3 1,3	$2,5 \times 10^6$ $2,5 \times 10^6$	T 15 ² T 18 ²	0 0	1,3 0	1,0 0	1,0 0	
23	T 31 32 33 34	$10,1 \times 10^8$	24	2,15 2,15	$5,0 \times 10^6$ $5,0 \times 10^6$	T 39 T 41 ²	1,3 0	2,2 0	2,5 0	2,2 0	
	T 56 57 58 59			2,9 2,9	$5,5 \times 10^6$ $5,5 \times 10^6$	T 51 T 53 ²	1,3 0	1,9 0	1,0 0	— 0	
25	T 21 22	$16,05 \times 10^8$	24	1,3 1,3	$8,0 \times 10^6$ $8,0 \times 10^6$	T 26 T 27 ²	0 0	1,0 0	1,0 0	0 0	
	B 1 B 2			1,7 1,7	$2,3 \times 10^7$ $2,3 \times 10^7$	B 9 ² B 10 ²	0 0	1,3 0	1,0 0	— —	
27	B 4 B 6	$5,0 \times 10^9$	24	1,2 1,2	$2,5 \times 10^7$ $2,5 \times 10^7$	B 13 ² B 15 ²	1,0 0	1,6 0	1,6 0	1,0 —	
	T 9 T 10			1,2 1,2	$2,7 \times 10^7$ $2,7 \times 10^7$	T 16 ² T 19 ²	1,3 0	2,2 1,3	2,2 1,0	— —	
29	T 96 97 99 100	$10,6 \times 10^8$	48	3,4 3,4	$5,3 \times 10^6$ $5,3 \times 10^6$	T 102 T 101 ²	2,2 0	2,2 0	1,9 0	— 0	
	T 94 95 96			4,8	$7,7 \times 10^6$	T 104 ²	0	0	0	0	

^{1)*} Suspension de rate traitée à l'eau distillée

v

fragments ne contiennent plus d'antigène en quantité suffisante pour provoquer une immunisation active. Dans les expériences où nous avons employé comme donneurs des animaux préalablement immunisés, on pourrait admettre que la destruction doit être encore plus rapide, car Dixon et Talmage [7] ont montré que des antigènes protéidiques sont beaucoup plus rapidement catabolisés dans l'organisme d'un animal immunisé que d'un animal neuf.

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Cette étude avait pour but de préciser les conditions dans lesquelles on peut transférer à l'aide de fragments de rate d'un lapin immunisé la capacité de produire des anticorps à un animal neuf.

Nous croyons avoir démontré qu'il s'agit, dans ce cas, d'une réelle formation d'anticorps et non d'une immunisation passive par des anticorps déjà présents dans la rate du « donneur ». En effet, l'injection de fragments de rate contenant des cellules lysées, c'est-à-dire du broyat traité à l'eau distillée, est incapable de faire apparaître dans le sang du lapin « receveur » des anticorps décelables par l'agglutination microbienne. Tandis que des lapins ayant reçu une suspension de fragments de la rate contenant des cellules vivantes, non lysées par un traitement à l'eau distillée, présentent des titres d'agglutination appréciables. Même en utilisant, pour faire l'extrait à l'eau distillée, des rates d'animaux ayant un titre élevé ($> 10^4$), on n'a pas pu constater la présence d'anticorps chez le « receveur ». Il est évident que les anticorps provenant même d'une suspension de cellules riches en anticorps sont tellement dilués dans l'organisme qu'ils ne sont plus décelables par la technique employée ici. On trouve cependant chez les « receveurs » des titres appréciables, ce qui prouve que les anticorps trouvés chez ces animaux, même le lendemain de l' inoculation du broyat de la rate, ne proviennent pas d'une « extraction » des anticorps présents dans la rate, mais d'une néo-formation par les cellules vivantes de la rate, transférées au « receveur ».

D'autre part, on aurait pu supposer qu'en transférant des fragments de rate d'un animal ayant reçu peu de temps auparavant une injection de vaccin, on provoquerait une immunisation active des lapins « receveurs » par l'antigène susceptible d'être présent dans les fragments de rate. Nos expériences ont montré qu'à partir de la vingt-quatrième heure après l'injection, la rate ne renferme plus d'antigène, ou des quantités insuffisantes pour induire une immunisation active (à l'exception du lapin T 19, tableau III). L'apparition rapide des anticorps dans la circulation des lapins « receveurs » plaide d'ailleurs aussi contre une telle hypothèse. Enfin, Topley a constaté que l'animal ayant reçu une injection de fragments de rate ne se comporte pas comme un animal ayant été vacciné activement, puisqu'il ne réagit pas à une nouvelle injection de l'antigène comme le ferait un animal déjà immunisé.

Nous croyons pouvoir dégager de nos expériences un autre fait important : l'intervention du facteur temps dans l'apparition des anticorps dans la circulation des animaux, qu'ils soient « donneurs » ou « receveurs ». En effet, prenons d'abord le cas du transfert d'une rate d'un animal au quatrième jour après l'injection de microbes ; la production d'anticorps chez le « receveur » semble s'installer immédiatement (on pourrait dire simplement qu'elle continue dans le nouveau milieu) et si l'on compare les courbes de formation d'anticorps chez un témoin analogue à un « donneur » et chez des « receveurs » (fig. 1),

on voit qu'elles sont presque parallèles avec un décalage d'un jour ; le maximum est atteint par le receveur deux jours après l'inoculation des fragments de la rate et, donc, au sixième jour après l'injection de la suspension microbienne au « donneur ». Or, le titre maximum est atteint chez les lapins « donneurs » entre le cinquième et le septième jour après l'injection de rappel. Dans les autres expériences de cette série (tableau I) lorsque les prélèvements des rates ont été effectués plus tôt, la période de latence avant l'apparition des anticorps chez les « receveurs » et le temps nécessaire pour qu'ils atteignent le titre maximum sont plus grands, ce qui correspond aussi au temps nécessaire au « donneur » pour atteindre le titre maximum. Chez le « receveur » ce titre sera donc atteint plus ou moins vite suivant le stade où se trouve la rate du « donneur » au moment de son prélèvement.

Nous voudrions encore souligner le fait que cette méthode permet l'obtention de résultats reproductibles (1). En effet, si des quantités égales d'un même broyat ont été transférées à des animaux neufs, les titres en anticorps apparus chez ces derniers ont été semblables, et ceci surtout si on utilise des rates d'animaux bons producteurs d'anticorps. Par contre, lorsque des quantités différentes de broyats de rate ont été transférées, les titres des anticorps chez les « receveurs » ont été grossièrement proportionnels aux quantités inoculées, surtout dans les premiers jours après ce transfert. Il est évident qu'on ne peut espérer une proportionnalité quelconque lorsqu'on essaye de comparer des broyats de rates de lapins différents, puisqu'on sait que la capacité de production d'anticorps varie beaucoup d'un animal à un autre.

La possibilité d'obtenir rapidement la production d'anticorps chez des lapins neufs et à des titres semblables, pourrait faire croire que l'injection de fragments de rate dans le péritoine du lapin offre des conditions très favorables à la survie des cellules productrices d'anticorps contenues dans ces fragments. Cependant, les travaux de Medawar [8] et de Darcy [9] ont montré que des greffons, même lorsqu'ils proviennent d'animaux de la même espèce sont toujours détruits. L'étude des localisations des fragments de rate inoculés et leur examen microscopique nous ont révélé que ces fragments sont agglutinés et subissent déjà une nécrose partielle vingt-quatre heures après leur transfert. Il n'est pas impossible que les fragments flottant librement ou étant lâchement fixés dans le péritoine (et surtout à l'épipoon) soient capables de fabriquer des anticorps dans les premières heures

(1) Comme d'ailleurs d'autres méthodes immunologiques passives (protection passive par un immunsérum, anaphylaxie passive).

après le transfert, mais il est difficile de supposer que cette production puisse continuer dans ces petits fragments ailleurs que dans l'épiploon, puisqu'ils deviennent rapidement nécrotiques. En effet, l'inoculation de petites quantités de broyat de rate est capable de provoquer l'apparition d'un titre assez élevé, si la rate a été prélevée quatre jours après l'injection de microbes au « donneur » (expériences n°s 4 et 11), tandis que pour obtenir des titres élevés lorsqu'on utilise des rates prélevées plus tôt, et donc incapables de fabriquer aussitôt des anticorps, des quantités plus importantes de broyat sont nécessaires (voir expériences n°s 8, 9 et 10) puisque la plupart des fragments seront rapidement nécrosés. Cependant, la production d'anticorps pourrait avoir lieu dans les agrégats de fragments localisés ou implantés dans l'épiploon. La réaction réticulo-plasmocytaire que l'on observe dans l'épiploon se produit même lorsqu'on injecte des fragments de rate normale et est probablement la réaction de défense caractéristique de ce tissu contre toute pénétration d'éléments étrangers. Il nous semble cependant important de souligner la forte réaction plasmocytaire provoquée dans l'épiploon par l'injection de fragments contenant des cellules vivantes, tandis que les cellules lysées par l'eau distillée ne donnent qu'une réaction bien plus faible.

Les titres analogues, sinon identiques, que l'on trouve chez des lapins inoculés avec les mêmes quantités d'un broyat semblent étonnantes lorsqu'on se rend compte que la majeure partie des fragments est si rapidement (vingt-quatre heures) nécrosée, et ne peuvent s'expliquer qu'en supposant que les fragments inoculés dans le péritoine forment des agrégats similaires dans l'épiploon. L'expérience n° 16 a été réalisée pour s'en rendre compte : 3 lapins ont reçu le même broyat et ont été tués vingt-quatre heures après. Ils avaient, à ce moment, des titres d'anticorps similaires et les fragments de rate formaient dans l'épiploon des agrégats de dimensions analogues chez les trois animaux.

On ne possède actuellement pas de renseignements précis sur le mécanisme de la formation d'anticorps (et de protéides en général), mais il semble qu'il doit comporter un système, peut-être très complexe, d'actions enzymatiques [10, 11]. Nos expériences ont montré que le transfert de la capacité de synthétiser des anticorps peut être réalisé lorsqu'on injecte des cellules vivantes bien que la très grande majorité de ces cellules soit nécrosée très rapidement, avant même que le taux des anticorps circulants ait atteint un titre maximum. On est ainsi amené à admettre ou bien que les quelques cellules restées vivantes (inférieures à 5 p. 100) sont capables de produire ces anticorps, ce qui semble peu probable, ou bien que le système enzymatique responsable de cette synthèse peut persister malgré l'apparence nécrotique des cellules transférées. Des auteurs, comme Cas-

person et Brachet, admettent que la synthèse des protéides a lieu dans des éléments cytoplasmiques. On pourrait donc se demander si ces éléments continuent à fonctionner dans les cellules en voie de nécrose, ou bien s'ils sont transférés dans les cellules de l'hôte qui entourent les fragments injectés. En tout cas, le fait que les cellules lysées par l'eau distillée soient incapables de transférer la capacité de synthétiser les anticorps pourrait être expliqué en admettant que ce traitement brutal, qui est capable de détruire également les éléments cytoplasmiques, aboutit à la destruction du système enzymatique envisagé, Michelazzi [12], en injectant à des animaux des mitochondries ou même des nucléoprotéides des cellules hépatiques d'un animal immunisé, constate l'apparition d'anticorps. Malheureusement les expériences de cet auteur comportent des lacunes : absence d'essais-témoins et d'appréciations quantitatives. Mais de toute façon des recherches supplémentaires sont nécessaires pour apporter des arguments aux hypothèses que nous venons d'envisager.

La partie expérimentale de ce travail était terminée lorsque, au cours d'un voyage aux Etats-Unis, l'un de nous a pu assister à la présentation de trois communications sur des sujets analogues [13] et a pu, en participant à la discussion, souligner la similitude des résultats acquis par les auteurs de ces communications, qui ont utilisé des antigènes ou des organes différents, avec nos observations décrites dans la première partie de ce mémoire.

CONCLUSIONS.

Une suspension de fragments de rate de lapins, producteurs d'anticorps, inoculée dans le péritoine de lapins neufs provoque l'apparition d'anticorps dans le sérum de ces derniers. Cette apparition est d'autant plus rapide que le prélèvement de la rate de l'animal « donneur de rate » a été fait plus tardivement après la vaccination. Ainsi, par exemple, les anticorps apparaissent en dix-huit heures si le prélèvement a été fait le quatrième jour après l'injection du vaccin. Si les fragments de rate ont été au préalable lysés par l'eau distillée, leur injection n'a pas d'effet. L'apparition des anticorps dans la circulation des lapins « receveurs de rate » est due à une néoformation d'anticorps et non à un transfert d'anticorps contenus dans les fragments injectés, ou à une vaccination active par l'antigène qu'ils auraient pu contenir. Les taux d'anticorps chez les « receveurs » de cellules vivantes dépendent de la quantité de suspension transférée et on observe des taux similaires chez plusieurs animaux en les inoculant avec des quantités identiques d'une même suspension. L'examen histologique des fragments de rate inoculés, que l'on retrouve surtout encastrés dans l'épiploon, montre qu'ils subissent une nécrose

très rapide, comme les greffons de tissus. Diverses hypothèses susceptibles d'expliquer l'apparition d'anticorps malgré la nécrose des cellules ont été envisagées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DEUTSCH. Ces *Annales*, 1899, **43**, 689.
- [2] A. B. LUCKHARDT et F. BECHT. *Am. J. Physiol.*, 1911, **28**, 257.
- [3] W. W. C. TOPLEY. *J. Path. Bact.*, 1930, **33**, 339.
- [4] A. FAGRAEUS et K. BERGLUND (sous presse).
- [5] A. FAGRAEUS. *Acta med. Scand.*, 1948, suppl. 204.
- [6] S. GARD. *Ztschr. Hyg.*, 1938, **120**, 615.
- [7] F. J. DIXON et D. W. TALMAGE. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 123.
- [8] P. B. MEDAWAR. *J. Anat.*, 1944, **78**, 176.
- [9] D. A. DARCY. *Nature*, 1949, **163**, 99 ; *Philos. Tr. Roy. Soc. London B.*, 1952, **236**, 463.
- [10] F. M. BURNET et F. FENNER. *The production of antibodies*, 2^e édit., Melbourne, 1949, Macmillan et C^o édit.
- [11] P. GRABAR. Ces *Annales*, 1950, **79**, 640.
- [12] L. MICHELAZZI. *Boll. Ist. Sierot. Milan.*, 1950, **29**, 28 ; 1951, **30**, 105.
- [13] T. N. HARRIS, S. HARRIS et M. FARBER ; A. B. STAVITSKY ; O. A. WAGER et M. W. CHASE. *Feder. Proceed.*, 1952, **11**, 470, 482, et 485.

ANÉMIE HÉMOLYTIQUE EXPÉRIMENTALE
PAR HÉTÉRO-IMMUNSÉRUMS CHEZ LE CHIEN.
MISE EN ÉVIDENCE,
A L'AIDE DE LA RÉACTION DIRECTE DE COOMBS,
DE LA FIXATION DES PROTÉINES DE L'ANIMAL
SUR SES PROPRES GLOBULES ROUGES

par J. SAMAILLE, C. ROPARTZ et A. EYQUEM (*).

(Institut Pasteur Lille et Paris.)

Le mécanisme pathogénique des syndromes hémolytiques a déjà été l'objet de nombreux travaux, mais il semble bien que certains processus nous soient encore obscurs. Certains auteurs ont déjà remarqué que l'activité hémolytique ou agglutinante des anticorps, dont l'injection déclanche chez l'animal une anémie hémolytique expérimentale, possède *in vivo* une activité souvent supérieure à celle notée *in vitro*. Dès 1913, Banti avait supposé que l'animal en expérience présente une augmentation du processus hémolytique du fait de l'intervention de la rate. Muir, en 1912, a émis l'hypothèse que l'organisme de l'animal injecté est capable de dissocier les complexes antigène-anticorps formés au cours des processus hémolytiques *in vivo*, l'hémolysine se comportant, comme l'a fait remarquer Heidelberger, comme un véritable enzyme. L'un de nous avait déjà constaté que certains sérums hétéro-spécifiques de lapin anti-globules rouges de chat, bien que présentant pour le chien une activité agglutinante aussi élevée que le titre obtenu avec les globules rouges de chat, entraînaient un syndrome hémolytique beaucoup moins grave que chez le premier animal.

Au cours de ces expériences, on avait pu remarquer la résistance de certaines espèces animales, telles que la souris par exemple, à l'injection de certains sérums hémolytiques. Bien que l'inaptitude du complément homologue puisse, dans certains cas, être rendue responsable de cette absence d'activité, comme le montrent les recherches effectuées indépendamment par Laporte

(*) Société Française de Microbiologie. Séance du 6 novembre 1952.

et par Rice, on peut supposer que l'érythrophagocytose hépatique ou splénique peut être en relation avec les opsonines beaucoup plus qu'avec les agglutinines. Cette érythrophagocytose peut permettre d'expliquer la facilité d'obtention d'une anémie hémolytique expérimentale chez le jeune chat ou chez le jeune chien, chez lesquels nous avons pu constater l'abondance de l'érythrophagocytose hépatique et splénique. Mais il est possible que d'autres facteurs interviennent et possèdent une action hémolytique propre.

C'est dans le but de préciser le mécanisme pathogénique de certains de ces syndromes hémolytiques que nous avons pris le chien comme animal d'expérience. Cet animal a déjà été l'objet des études de Banti, puis de Bennati et Pla, de Titgert et enfin de Formaggio et Piovella, qui ont remarqué sa sensibilité à l'injection d'hétéro-immun-sérum. L'un de nous, en 1948, a constaté que les lésions parenchymateuses apparaissant au cours des anémies hémolytiques chez le jeune chien intéressaient tous les organes et tout spécialement le rein et le foie et, dans le cas d'ictère grave, se compliquaient d'un ictère nucléaire expérimental typique. Le même auteur a réalisé aussi une anémie hémolytique expérimentale à l'aide d'iso-immun-sérum. Un syndrome analogue a été réalisé par L.-E. Young. Mais chez le chien adulte, ce n'est qu'avec des hétéro-immun-sérum qu'il est possible d'obtenir un syndrome hémolytique avec de faibles doses de sérum.

Nous avons pu parvenir à préciser les quantités de sérum qu'il est nécessaire d'administrer par voie intraveineuse à un chien adulte pour obtenir une anémie d'un taux déterminé en douze heures. Avec l'hétéro-immun-sérum de lapin anti-globules rouges de chien dont nous nous sommes servis, le résultat a pu être obtenu avec une dose de sérum hémolytique de 0,45 ml par kilogramme de poids d'animal, injectée par voie intraveineuse en une fois.

Les animaux que nous avons étudiés ont été répartis en 3 lots. Certains chiens étaient des animaux non préparés, chez lesquels on a suivi l'évolution des signes cliniques hématologiques et sérologiques. Chez d'autres animaux, nous avons étudié l'action de l'xsanguino-transfusion. Enfin, un troisième lot d'animaux était composé de chiens immunisés, au préalable, vis-à-vis du sérum de lapin normal et possédant donc des anticorps anti-sérum de lapin.

Chez tous ces animaux nous avons étudié l'évolution des signes hématologiques ainsi que l'évolution de l'hématocrite, du taux d'hémoglobine, du diamètre moyen et de l'épaisseur des hématices ainsi que l'indice de sphérocytose, l'évolution de la résistance osmotique. De plus, nous avons apprécié le titre des hétéro-agglutinines injectées chez l'animal receveur ainsi que l'inten-

sité de la réaction directe de Coombs. Cette réaction a été réalisée de deux manières ; d'une part, à l'aide d'un sérum de cobaye anti-sérum de lapin, convenablement absorbé à l'aide de globules rouges de chien, permettant de déceler les hétéro-anticorps de lapin fixés sur les globules rouges du chien injecté. D'autre part, nous avons effectué la réaction directe de Coombs (1) à l'aide

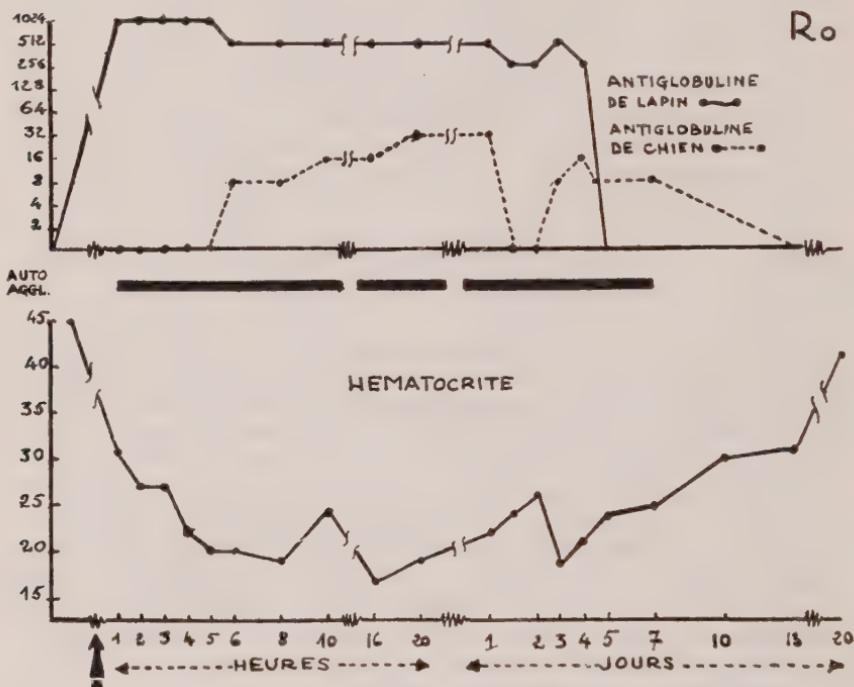


FIG. 1.

d'un sérum de lapin anti-globuline de chien, absorbé à l'aide de globules rouges de chien, citratés puis lavés.

Chez les *animaux témoins non préparés*, nous avons constaté d'une manière générale, que l'injection de sérum hémolytique de lapin anti-globules rouges de chien, chauffé à 56°, trente minutes, provoque une chute de l'hématocrite de 45 à 27 en l'espace de quatre à six heures. A la vingtième heure, l'hématocrite remonte

(1) Cette réaction a été réalisée sur les globules rouges lavés cinq fois avec de l'eau physiologique à 37° dès leur prélèvement, pour éviter la fixation d'une cryoagglutinine incomplète.

légèrement, puis présente une rechute au troisième ou quatrième jour et amorce sa remontée définitive le cinquième jour.

L'étude de la réaction directe de Coombs à l'aide du sérum anti-globuline de lapin permet de constater que cette réaction devient très fortement positive dans les heures qui suivent l'injection du sérum hémolytique et reste positive en plateau jusqu'au cinquième jour environ, date à laquelle se fait la remontée définitive de l'hématocrite. Ce phénomène étant en rapport avec la fixation des hétéro-anticorps de lapin sur les globules rouges de chien.

Mais nous avons eu la surprise de constater, et ce fait n'avait pas encore été observé, que la réaction directe de Coombs, effectuée avec un sérum anti-globuline de chien, apparaît aussi positive la cinquième heure, augmente d'intensité jusqu'à la vingt-quatrième heure et, fait important, reste positive pendant plus longtemps que la réaction effectuée à l'aide de sérum anti-globuline de lapin.

Les deux phénomènes observés sont bien spécifiques. Il est normal de constater la positivité d'une réaction directe de Coombs avec le sérum de cobaye anti-globuline de lapin, indiquant la fixation des anticorps de lapin sur les globules rouges de chien. Pour expliquer la positivité de la réaction directe de Coombs avec le sérum de lapin anti-globuline de chien, on ne peut pas faire intervenir de communauté antigénique entre la globuline de chien et la globuline de lapin, puisque c'est justement le lapin qui a fourni le sérum anti-globuline de chien et l'on ne connaît pas encore chez le lapin la possibilité d'immunisation à l'aide du sérum d'animaux de la même espèce. Ce phénomène est d'ailleurs constant. Tous les chiens mis en expérience ont présenté la fixation de protéines de chien sur leurs propres globules rouges, au cours des anémies hémolytiques expérimentalement réalisées. On constate en même temps l'apparition d'une auto-agglutination chez les animaux mis en expérience. Cette agglutination apparaît au bout de trente secondes *in vitro* aussi bien à 37° qu'à 20° ou à 4°. Son intensité se maintient pendant trois ou quatre jours après injection du sérum hémolytique, puis elle diminue graduellement jusqu'au huitième jour et disparaît à ce moment.

L'étude des animaux exsanguino-transfusés à l'aide de sang de chien de même groupe sanguin ainsi qu'en témoigne le chien P⁴ exsanguino-transfusé trois heures après l'injection de sérum hémolytique, montre que l'hématocrite qui était descendu jusqu'à 15 remonte à 35 et que la réaction directe de Coombs se négative transitoirement pendant quelques heures. Mais ensuite, ces réactions redeviennent positives aussi bien pour la globuline de lapin que la globuline de chien. L'exsanguino-transfusion n'empêche d'ailleurs nullement une chute de l'hématocrite de se faire au

troisième jour comme chez les animaux témoins non exsanguino-transfusés.

Il était intéressant d'étudier les propriétés du plasma provenant des chiens exsanguino-transfusés et de répéter chez le chien l'expérience que l'un de nous avait réalisée chez le chat avec M. H. Gelders.

Dans les plasmas provenant de chiens exsanguino-transfusés nous n'avons pas pu mettre en évidence d'hétéro-agglutinine libre,

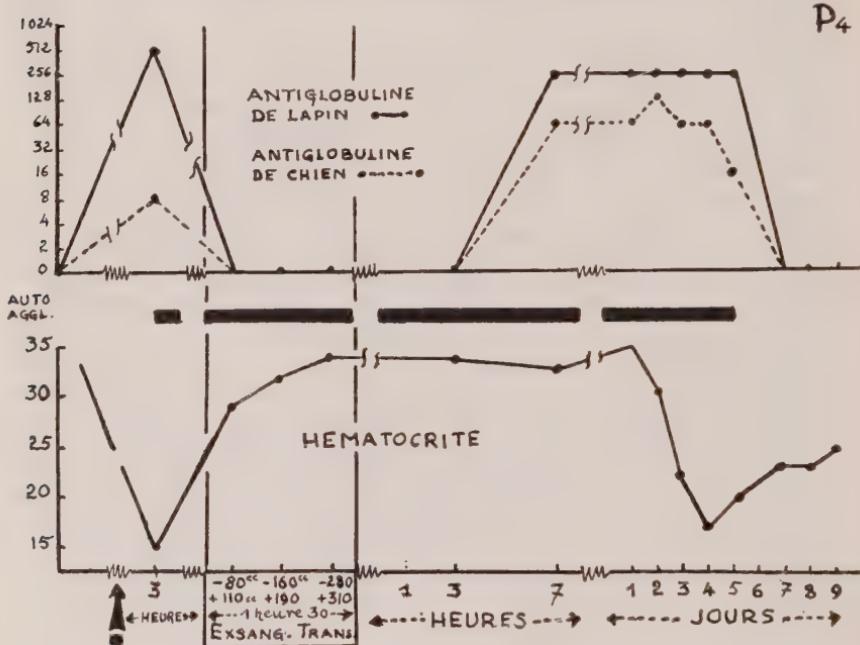


FIG. 2.

active sous forme complète ou incomplète vis-à-vis des globules rouges de chien. Cependant, nous avons constaté que l'injection de 10 cm^3 du plasma du chien P⁴ recueilli trois heures après l'injection de sérum hémolytique, au cours de l'exsanguino-transfusion, à un chien (R²) âgé de trois mois et pesant 1,500 kg a amené une chute de l'hématocrite de 40 à 27 p. 100. Nous avons constaté parallèlement une diminution du nombre de globules rouges de 4 600 000 à 3 000 000 et une diminution du taux de l'hémoglobine de 11,4 à 7,9 g. Cette anémie ne s'est accompagnée d'aucun des caractères décrits au cours de l'injection de sérum hémolytique : le diamètre moyen, l'indice de sphérocytose et la

résistance osmotique sont demeurés normaux. Cet animal n'a pas présenté d'auto-agglutination. Les réactions de Coombs effectuées avec du sérum anti-globuline de chien ou du sérum anti-globuline de lapin ont été négatives.

Ainsi, on peut constater qu'à côté du mécanisme protecteur il apparaît chez l'animal soumis à une anémie hémolytique expérimentale un processus hémolytique apparemment indépendant de la présence des hétéro-anticorps injectés. Nous avons pris auparavant soin de vérifier qu'il n'y avait pas d'incompatibilité de groupes sanguins entre les chiens exsanguinés et les chiens receveurs. Il n'était pas possible de mettre en évidence d'hétéro-agglutinines ou d'iso-agglutinines actives sous forme complète ou incomplète dans le plasma injecté.

L'un de nous avait obtenu antérieurement avec M. H. Gelders en expérimentant chez le chat des résultats identiques. Le sérum provenant du chat exsanguiné et bien que ne présentant pas d'hétéro-agglutinines décelables sous forme complète ou incomplète ou d'iso-agglutinines détermine une anémie très nette chez le jeune chat auquel on l'avait injecté.

Nous avons été amenés à étudier le comportement de chiens immunisés par le sérum de lapin, au cours de ces expériences, du fait que la globuline de lapin disparaît de la surface des globules rouges des chiens témoins au moment où s'amorce la remontée de l'hématocrite et que ce phénomène peut coïncider avec l'apparition des anticorps de chien anti-sérum de lapin.

Ainsi chez le chien R⁵ fortement immunisé au préalable vis-à-vis du sérum de lapin, nous avons constaté que l'injection d'une dose identique de sérum hémolytique n'entraîne qu'une diminution très légère de l'hématocrite, soit immédiate soit retardée au quatrième jour. Les atteintes hématologiques se sont révélées de même très discrètes. Par contre, la réaction directe de Coombs à l'anti-globuline de lapin chez ces animaux ne se comporte pas de la même manière que chez les témoins : elle se négative en quarante-huit heures, alors que la réaction directe de Coombs à l'anti-globuline de chien reste positive pendant six à sept jours. Par conséquent l'immunisation de chien vis-à-vis de sérum normal de lapin entraîne une protection contre l'action du sérum hémolytique de lapin, mais laisse persister un phénomène de fixation des protéines de l'animal examiné.

Nous faisons remarquer que le début du stade de régénération (cinquième-sixième jour) chez nos animaux traités par hétéro-immun-sérum s'oppose à celui des chiens traités par iso-immun-sérum, qui ne se manifeste que vers le vingtième jour. On peut expliquer ce retard par l'absence d'une réaction immunologique de défense, le chien n'étant pas capable de neutraliser les anticorps qu'on lui a injectés, s'ils sont iso-spécifiques. Au contraire,

l'immunisation se fait plus rapidement vis-à-vis de l'anticorps hétéro-spécifique. Il n'y a pas de concordance absolue entre la fixation des protéines du chien et l'évolution des signes hémato-logiques : la fixation se fait au moment où sont déjà installées la microcytose, la sphérocytose et l'augmentation de la fragilité globulaire. Elle ne disparaît qu'au septième jour chez les animaux témoins alors que les stigmates de l'hémolyse ont tendance à s'atténuer depuis deux jours. Les prélèvements

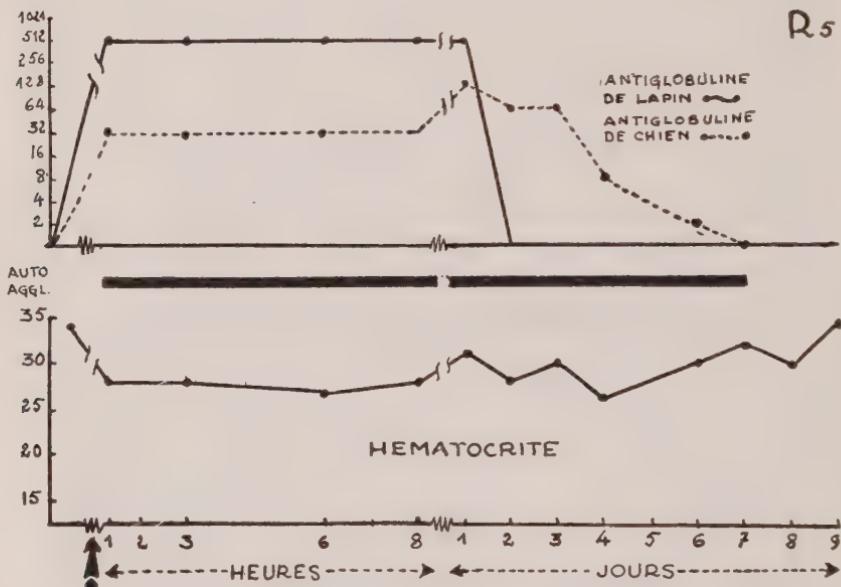


FIG. 3.

d'organes que nous avons effectués chez ces animaux nous ont permis d'étudier l'évolution des lésions tissulaires et en particulier cérébrales chez les animaux témoins, exsanguino-transfusés ou immunisés au préalable. Il semble en première analyse que l'exsanguino-transfusion effectuée précocement permette d'empêcher l'apparition de lésions cérébrales.

En conclusion : Il est possible de déterminer chez le jeune chien âgé de trois mois environ une anémie hémolytique expérimentale, par une seule injection intraveineuse de sérum hémolytique de lapin anti-globules rouges de chien, amenant en quelques heures une chute de l'hématocrite de 30 p. 100 environ.

L'étude immunologique de chiens neufs non préparés présen-

tant une anémie hémolytique expérimentale a permis de constater à l'aide de la réaction de Coombs que les globules de l'animal en expérience fixaient les hétéro-anticorps injectés, mais en même temps les protéines identifiées comme étant d'origine canine et provenant de l'animal en expérience.

L'exsanguino-transfusion à l'aide de sang compatible permet à l'animal en expérience de supporter son anémie hémolytique et semble susceptible, lorsqu'elle est précoce, d'empêcher l'apparition de lésions parenchymateuses graves. Le plasma de ces animaux exsanguinés se révèle capable de déterminer une anémie par injection à des jeunes chiens non préparés, bien qu'il ne contienne pas d'hétéro ou d'iso-anticorps décelable. Le même fait avait été déjà observé chez le chat soumis à une anémie hémolytique.

L'immunisation préalable de chiens vis-à-vis du sérum de lapin normal protège l'animal contre l'action de sérum hémolytique de lapin anti-globules rouges de chien, injecté par voie intraveineuse.

BIBLIOGRAPHIE

G. BANTI. *Semaine Méd.*, 1913, **33**, 313.
D. BENNATI et J. C. PLA. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 150.
A. EYQUEM. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 585.
A. EYQUEM. *Rev. Hématol.*, 1950, **5**, 353.
T. G. FORMAGGIO et C. PIOVELLA. *Hematologica*, 1950, **34**, 127.
R. LAPORTE. *Ces Annales*, 1952, **83**, 323.
R. MUIR et S. W. M'NEE. *J. Path. Bact.*, 1912, **47**, 92.
ROPARTZ. Thèse Fac. Médecine, Lille, octobre 1952.
J. SAMAILLE. *Anémies hémolytiques expérimentales du chien par Hétéro-Immunserums. Etude immunologique et histologique. Action de l'exsanguino-transfusion.* Thèse Fac. Médecine. Lille, octobre 1952.
W. D. TITGERT et C. N. DUNCAN. *Amer. J. Med. Sci.*, 1940, **200**, 173.
C. WASASTJERNA. *Acta Med. Scand.*, 1951, **140**, Supplément 258.
L. E. YOUNG, D. M. ERVIN et C. L. YUILE. *Blood*, 1949, **4**, 1218.

DÉTERMINATION DE LA SENSIBILITÉ MICROBIENNE AUX SULFAMIDES PAR UNE MÉTHODE DE DISQUES SÉCHÉS

par Y. CHABBERT, F. BOYER et MONIQUE DECHAVASSINE (*).

(*Institut Pasteur.*)

Actuellement, il semble souhaitable de pouvoir rechercher, en clinique, la sensibilité des germes aux sulfamides par une technique simple, analogue à celle des disques séchés utilisée pour les antibiotiques courants. L'obstacle majeur à cette recherche réside dans l'effet antisulfamide des milieux de culture usuels. De nombreuses solutions ont été proposées pour minimiser cet effet, qui permettent d'envisager l'utilisation pratique d'un tel test ; notamment Kokko [6] en 1947 a présenté une technique qui utilise un milieu très complexe.

EFFET ANTISULFAMIDE DES MILIEUX DE CULTURE.

Les sulfamides actifs *in vitro* dans le sang et le sérum perdent leur activité en présence de peptones (Lockwood [7]). L'effet antisulfamide des peptones est très élevé ; il peut être exprimé en acide para-amino-benzoïque par une méthode de dosage proposée par Lwoff, Nitti et M^{me} Tréfouël [9]. Les travaux de Tabone et Nitti (1942-1945) [13] ont montré que cet effet, qui varie considérablement d'une peptone à l'autre, n'est pas dû seulement à l'acide para-amino-benzoïque, mais aussi à certaines fonctions amines grasses appartenant à des peptides à poids moléculaire peu élevé. Ces auteurs n'ont cependant pas pu mettre en évidence la présence dans les peptones de substances qui, par elles-mêmes, aient un pouvoir antisulfamide notable, mais ils ont signalé des facteurs multiples : « facteurs antisulfamides proprement dits » et « facteurs exaltants » qui interviennent dans le mécanisme antisulfamide.

Les différentes espèces microbiennes ne sont pas également sensibles à l'effet antisulfamide des peptones. Les méningocoques et les gonocoques y sont peu sensibles (Roux et Chev^e [16],

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1953.

Hagerman [4], Walker [21] ; les pneumocoques (Lockwood [7], Nitti et Tabone [13], Sjöstedt [18]) et les *Pseudomonas* (Walker [21], Erlanson [2]) le sont faiblement. Par contre, les Entérobactéries : *Escherichia*, *Proteus*, *Shigella* et *Salmonella*, les Staphylocoques et les Streptocoques hémolytiques sont fortement influencés (Lockwood [8], McLeod [10], Muir [12], Rantz [15], Walker [21], Nitti et Tabone [13], Erlanson [2]).

Il semble même que, dans une espèce microbienne déterminée, la sensibilité à l'effet antisulfamide des peptones soit variable d'une souche à l'autre puisque Erlanson [2] signale que 14 p. 100 des coliformes seraient insensibles à cette action.

L'étude de la sensibilité aux sulfamides ne pouvant se faire pour l'ensemble des germes sur un milieu synthétique, on a proposé un certain nombre de milieux à faible pouvoir antisulfamide :

MILIEUX A BASE D'HYDROLYSAT DE CASÉINE. — McLeod [10], Frisk [3], Rantz [15]. Un milieu très complexe, comportant en outre de la pomme de terre et du sang, a été proposé par Kokko [6] sous le nom de C. P. B.-agar.

MACÉRATION OU INFUSIONS SANS PEPTONES. — Pike et coll. [14] ont proposé l'extrait de bœuf ou l'infusion de viande de lapin et Erlanson a obtenu de bons résultats avec l'infusion de placenta [2].

MILIEUX FAIBLEMENT PEPTONÉS. — Schmidt [19], Schweinburg et Rutenburg [17].

D'autre part, McLeod et Mirick [11] ont montré que les antisulfamides d'un bouillon de cœur de bœuf pouvaient être adsorbés sur charbon. Il ne semble cependant pas que cette adsorption puisse être obtenue de façon constante et totale (Lamensans).

Enfin, les globules rouges hémolysés de cheval se sont montrés, entre les mains de Harper et Cawston [5], capables de neutraliser l'effet antisulfamide des peptones. Walker [21] trouve qu'ils agiraient aussi en augmentant l'action des sulfamides. De ces deux actions, Erlanson [2] ne retient que la seconde et montre que, si le sang augmente nettement les diamètres des zones d'inhibition des souches peu sensibles, ce phénomène peut être dû à une modification de la courbe de diffusion du sulfamide.

CHOIX DU MILIEU DE CULTURE.

De cet ensemble de travaux, il ressort clairement, d'une part, que des résultats excellents et applicables en clinique peuvent être obtenus avec des milieux pauvres en effet antisulfamide,

mais que, d'autre part, cet effet ne peut être évalué que de façon très empirique.

En effet, l'évaluation de l'activité antisulfamide d'une substance protidique complexe par rapport à l'action de l'acide para-amino-benzoïque permet de comparer différents milieux dans des conditions définies. Mais les conditions d'activité du sulfamide et de culture du germe n'étant pas les mêmes dans les gammes de comparaison, il ne peut s'agir d'un véritable titrage, d'autant moins que les diverses espèces microbiennes n'ont pas la même sensibilité à l'acide para-amino-benzoïque et aux effets antisulfamides des peptones (Nitti et Tabone [13]).

Pour apprécier les milieux étudiés, nous nous sommes référés à certains critères pratiques formulés par Erlanson [2] en utilisant un certain nombre de souches de sensibilités connues.

MILIEUX LIQUIDES. — L'effet antisulfamide se traduit par une diminution plus ou moins complète d'activité et par une inhibition se répartissant sur plusieurs tubes. Dans un milieu pauvre en effet antisulfamide, le sulfamide doit inhiber les souches sensibles à des concentrations nettement inférieures aux concentrations obtenues dans les humeurs ($300-100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) avec des points limites nets.

MILIEUX GÉLOSÉS, TECHNIQUES DE DIFFUSION. — L'effet antisulfamide détermine une diminution de la zone d'inhibition des colonies ayant une croissance normale. Mais il se traduit surtout par une inhibition partielle sous forme de petites colonies de taille inférieure à la normale qui occupent soit la totalité de la zone d'inhibition, soit une zone de diamètre plus faible. Un milieu gélosé pauvre en antisulfamides sera un milieu qui donnera vis-à-vis d'une concentration fixe les plus grandes zones d'inhibition avec des limites nettes sans inhibition partielle.

Nous avons comparé avec ces critères différents milieux à base d'infusion de placenta ou de macération de bœuf additionnés ou non de peptone pepsique ou de peptones commerciales (Chapoteaut, Vaillant 5 B, Uclaf). Chaque milieu a été glucosé à 1 p. 100 et nous avons étudié l'effet de l'addition de 2 p. 100 de globules rouges hémolysés de cheval, chauffés ou non à 60°C pendant une heure.

Les sulfamides étudiés sont les suivants :

- A. *p*.amino-phényl-sulfamide (1162 F) ou Septoplix.
- B. *p*.amino-phényl-sulfamido-thiazol (2090 RP) ou Thiazomide.
- C. *p*.amino-phényl-sulfamido-méthyl-thio-diazol ou Rufol.
- D. *p*.amino-phényl-sulfamido-diazine (2616 RP) ou Adiazine.

Secondairement, nous avons étudié la méthylidiazine (2632 RP) Sumédine et la diméthylidiazine (2633 RP) ou Vertolan, ainsi que la *p*.amino-phényl-sulfamido-guanidine (2413 RP) Ganidan.

A titre d'exemple, nous donnons les résultats suivants obtenus avec des souches de staphylocoque (Staphyo 83) particulièrement sensible aux effets antisulfamides.

	CONCENTRATION INHIBITRICE en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	
	1162 F	2090 RP
A. — Milieux liquides :		
Infusion de placenta	60	6
Macération de bœuf	30	1,5
Macération de bœuf + peptone pepsique	125	6
Macération de bœuf + peptone Chapoteaut.	2 000	200
	DIAMÈTRE en mm Zone d'inhibition colonies normales	INHIBITION partielle : petites colonies
B. — Milieux gélosés (à base de macération de bœuf additionnés de) :		
Peptone Vaillant 5B	0	
Peptone Vaillant 5B + G.R. hémolysés	18	+
Peptone pepsique	28	++
Peptone pepsique + G.R. hémolysés	30	+
Sans peptone	30	++
Sans peptone + G.R. hémolysés chauffés	30	+
Sans peptone + G.R. hémolysés non chauffés.	35	0

Il ressort de l'ensemble des essais que l'infusion de placenta n'a pas donné des résultats supérieurs à la macération de bœuf. L'effet des globules hémolysés est net dans tous les cas, faisant disparaître plus ou moins complètement les zones d'inhibition partielle, quelle que soit la sensibilité de la souche ; ce qui suggère, en accord avec Harper et Cawston [5], une inhibition directe de l'effet antisulfamide.

Le milieu suivant, qui convient à la croissance de tous les germes pathogènes, nous a paru pouvoir être utilisé, sous réserve que chaque lot de macération soit soumis à un contrôle montrant son effet antisulfamide faible :

pH 7,4	Macération de viande de bœuf	1 l
	Phosphate disodique.	2 g
	NaCl.	3 g
	Glucose.	1 g
	Gélose	15 g

Réparti à raison de 25 cm^3 par tube, au moment de l'emploi,

le milieu fondu et refroidi à 45° C est additionné de 2,5 cm³ d'une solution à 20 p. 100 de globules rouges hémolysés de cheval.

ENSEMENCEMENT.

Presque tous les auteurs signalent que l'action des sulfamides se modifie considérablement suivant le nombre de germes ensemençés ; ils insistent sur la nécessité d'utiliser des inoculum constants.

Les résultats, ci-après, obtenus avec 4 sulfamides différents, montrent que l'effet sur les zones d'inhibition est particulièrement net :

STAPHYLOCOQUE 209 P	DIAMÈTRE EN MM (Moyenne sur 3 déterminations)			
	Sulfamides			
Inocu'um :	A	B	C	D
1.	33	29,7	26,7	23,8
1/10	37,5	33	29,5	27,2
1/100.	40	36	32	28,6
1/1 000.	42	37,2	33,2	30,6

Pour les inoculum faibles, la variation diminue ainsi que l'effet antisulfamide du milieu.

Dans la pratique, une culture de vingt-quatre heures du germe à tester est diluée à 10⁻³, 10⁻⁴, et 1 goutte étalée sur la boîte. Il faut que les colonies soient séparées.

DISQUES. — A. *Préparation.* — Des disques de 10 mm de diamètre sont découpés dans du papier buvard moyen (force 40 kg) et stérilisés.

Ces disques sont saturés avec les sulfamides en solution dans l'acétone et séchés sur plaques à 37° C sous courant d'air chaud stérile.

L'erreur standard, mesurée sur 40 déterminations avec une souche sensible, est voisine de 1 mm.

B. *Choix des concentrations.* — Pour déterminer la concentration de la solution qui permettra d'obtenir, avec un disque, une échelle de diamètres valables pour les concentrations humorales habituelles, on se heurte dans le cas des sulfamides à un problème difficile. En effet, il n'y a pas de concordance pour toutes les espèces microbiennes entre le diamètre de la zone d'inhibition et les concentrations inhibitrices en milieu liquide. Erlanson [2] a montré que ce fait peut s'expliquer par les conditions très différentes d'activité du sulfamide sur gélose et en milieu liquide.

De plus, les valeurs des concentrations inhibitrices trouvées en milieu liquide peuvent difficilement être rapprochées des concentrations humorales ; les déterminations faites en milieu synthétique donnent des valeurs trop basses de la sensibilité et les milieux complexes comportent toujours une certaine part d'effet antisulfamide. Les déterminations en milieu liquide, qui servent habituellement de référence pour les autres antibiotiques, constituent ici une base beaucoup moins sûre et il est très vraisemblable que les différences de diamètre observées avec une méthode de diffusion sont plus valables que les différences de point inhibiteur limite.

Pour chaque sulfamide, nous avons établi des courbes standard de diffusion (chaque point étant répété quatre fois) pour 4 à 6 germes sensibles d'espèces différentes. En opérant dans les conditions habituelles du test, on peut déterminer la pente moyenne de la courbe de diffusion. Ensuite, sur un nombre limité de souches-tests bien connues, soit par leur sensibilité *in vitro* en milieu synthétique, soit surtout par leur sensibilité *in vivo* dans les essais thérapeutiques chez l'animal, nous avons cherché la concentration qui donne des diamètres élevés pour les plus sensibles et très faibles pour les souches qui montrent une sensibilité limite. Enfin, nous avons titré 400 souches appartenant à diverses espèces pathogènes et nous avons cherché si les différences de sensibilité traduites par les différences de zones d'inhibition se retrouvaient en milieu liquide et quelquefois *in vivo*.

Les concentrations adoptées finalement ont été les suivantes :

Sulfamides : A : 50 mg/cm ³	B : 2 mg/cm ³
C : 5 mg/cm ³	D : 2,5 mg/cm ³

(Pour certains, on atteint la limite de la solubilité.)

Dans ces conditions, les souches dont la zone d'inhibition est supérieure à 35 mm ont toujours été inhibées *in vitro* par des concentrations très inférieures aux concentrations humorales. Elles peuvent donc être considérées comme très sensibles.

Les souches ne montrant pas de zone d'inhibition se sont toujours montrées résistantes en milieu liquide à des concentrations à la limite de la solubilité des différents sulfamides.

Celles qui présentent des zones comprises entre 20 et 35 mm ont montré une sensibilité moyenne. Ces souches titrées soit en milieu synthétique, soit en bouillon macération de bœuf, ont toujours été inhibées par des concentrations inférieures aux concentrations humorales. Nous avons cherché à établir des courbes de concordance entre les diamètres des zones d'inhibition et les taux de concentrations inhibitrices en milieu liquide. Nous n'avons pu obtenir un groupement suffisant des points qui permette d'établir une liaison satisfaisante entre ces deux valeurs.

VALEUR DU TEST.

Avec la technique que nous avons étudiée, il ne peut être question d'un test quantitatif analogue à celui utilisé pour les antibiotiques (lorsque l'on emploie notamment les différences de diamètre entre une souche-test et une souche-étalon (Chabbert [1]). Il ne peut s'agir que d'un test qualitatif.

De plus, sur les 400 souches titrées vis-à-vis des 4 sulfamides envisagés, nous n'avons pas trouvé de souche très sensible à un sulfamide et résistante aux autres, mais nous avons observé des différences faibles. Ces différences coïncident avec, par exemple, les différences d'activité relative du sulfamide et de la sulfadiazine sur les Staphylocoques et les Coliformes, mais elles ne sauraient être considérées comme applicables en clinique. Le test ne peut donc permettre le choix du sulfamide. Ce choix reste toujours subordonné, en clinique, à de multiples facteurs tels que la toxicité, la diffusion, etc. plutôt qu'à l'activité *in vitro*.

En *résumé*, la technique que nous proposons ne permet pas le choix d'un sulfamide, mais constitue *un test qualitatif de la sensibilité d'une souche aux sulfamides en général*. Pratiquée dans des conditions standard avec des milieux contrôlés, elle est néanmoins susceptible de rendre de grands services au clinicien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. clin.*, 1951, **9**, 544.
- [2] P. ERLANSON. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1951, suppl. 85.
- [3] A. R. FRISK. *Acta Med. Scand.*, 1943, suppl. 142.
- [4] G. HAGERMAN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1942, suppl. 46.
- [5] G. J. HARPER et W. C. CAWSTON. *J. Path. a. Bact.*, 1945, **57**, 59.
- [6] U. P. KOKKO. *Ann. Med. exp. Biol. Fenniae*, 1947, **25**, 79.
- [7] J. S. LOCKWOOD. *J. Immunol.*, 1938, **35**, 155.
- [8] J. S. LOCKWOOD et M. M. LYNCH. *J. Am. Med. Assoc.*, 1940, **114**, 935.
- [9] A. LWOFF, F. NITTI, M^{me} T. TRÉFOUËL et M^{me} V. HAMON. Ces *Annales*, 1941, **67**, 9.
- [10] C. M. MCLEOD. *J. exp. Med.*, 1940, **72**, 217.
- [11] C. M. MCLEOD et G. S. MIRICK. *J. Bact.*, 1942, **44**, 277.
- [12] R. D. MUIR, V. J. SHAMLEFFER et L. R. JONES. *J. Bact.*, 1942, **44**, 95.
- [13] F. NITTI et J. TABONE. Ces *Annales*, 1942, **68**, 360.
- [14] R. M. PIKE et A. ZIMMERMAN FOSTER. *J. Bact.*, 1944, **47**, 97.
- [15] L. A. RANTZ et W. M. M. KIRBY. *J. Immunol.*, 1944, **48**, 29.
- [16] E. ROUX et J. CHEVÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 989.
- [17] F. B. SCHWEINBURG et A. M. RUTENBURG. *J. Lab. Clin. Med.*, 1949, **34**, 1457.

- [18] S. SJÖSTEDT, G. VAHLUE et N. BERG. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1942, **19**, 405.
- [19] W. H. SCHMIDT et A. J. MAYER. *J. Bact.*, 1944, **47**, 199.
- [20] J. TABONE. *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1944, **26**, 137.
- [21] N. WALKER, R. PHILIP, M. M. SMYTH et J. W. MACLEOD. *J. Path. a. Bact.*, 1947, **59**, 631.

STRUCTURE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

I. — FRACTIONNEMENT DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES PAR L'ACIDE ACÉTIQUE. APPLICATION A L'ÉTUDE DE L'ACTION ENZYMATIQUE DE LA RIBONUCLÉASE (*)

par P. VIGNAIS.

(Institut Pasteur. Service de Chimie biologique
[professeur MACHEBOËUF].)

L'étude cinétique de l'action de la ribonucléase nécessite un test précis d'évaluation des polynucléotides de différents poids moléculaires qui résultent de cette action. Nous avons à cet effet utilisé la précipitation fractionnée par l'acide acétique cristallisante.

La précipitation acide des acides nucléiques était connue depuis longtemps. Chantrenne [1] utilisa l'acide acétique pour précipiter les fractions hautement polymérisées (un volume de solution nucléique pour un volume d'acide acétique). Il proposa également [1] d'autres milieux précipitants, tels :

2 volumes	Acide acétique
1 volume	Acétone.
2 volumes	Eau.

ou encore :

1 volume	Acide acétique.
1 volume	Acétone.
7 volumes	Eau.

et recueillit le précipité obtenu par addition de 1 volume du mélange à 1 volume de solution nucléique.

Ghuysen [2], cependant, a montré que les hauts polymères isolés par Chantrenne manquent encore d'homogénéité : d'après leur courbe de solubilité, ils comporteraient deux fractions au moins. Ghuysen a proposé un nouveau mélange précipitant. méthanol + tampon acide acétique-acétate de sodium de force ionique 0,10.

Récemment, Vandendriessche [3], s'inspirant des méthodes de Chantrenne, s'est servi du mélange :

2 volumes	Acétone.
1 volume	Acide acétique.
1 volume	Eau.

mis en présence d'un égal volume de solution d'acide nucléique.

Nous avons tenté de différencier par précipitation acétique les différents états de polymérisation de l'acide nucléique de levure. Une faible quantité d'acide acétique ajoutée à un certain volume de solution d'acide ribonucléique précipite la fraction hautement polymérisée de cet acide ribonucléique ; mais lorsque des quantités croissantes d'acide acétique sont ajoutées, on observe une précipitation progressive de polymères de poids moléculaires plus faibles. Les fractions ainsi précipitées possèdent des poids moléculaires d'autant plus faibles que la quantité d'acide acétique ajoutée est plus grande.

Nous avons utilisé de l'acide ribonucléique à l'état de sel de sodium provenant des Etablissements Prolabo. D'abord dissous dans une solution alcaline diluée, il fut purifié par la méthode de Sevag [4].

Cette méthode permet d'éliminer les protéines ; elle a pour principe la dénaturation des protéines par étalement aux interfaces. La solution à purifier est agitée avec du chloroforme. Les protéines se dénaturent progressivement et se rassemblent dans l'émulsion de chloroforme qu'on élimine par centrifugation. La solution nucléique, dont le pH est ajusté entre 5 et 6, est alors additionnée de 3 volumes d'alcool. Le précipité est repris, puis séché par l'alcool absolu. Le ribonucléate ainsi obtenu est facilement soluble dans l'eau. Notons qu'il n'est pas homogène quant au poids moléculaire : il s'agit d'un acide ribonucléique polydispersé.

Le premier échantillon de ribonucléate, que nous désignerons par N₁, est dissous dans de l'acide borique 0,2 M à la concentration de 7,5 mg/ml. Le pH final est 5,6. Le tableau suivant

TABLEAU I.

Acide acétique pour précipiter 1 volume d'A.N., en volumes	1	2,5	5	10	15	20
Phosphore du précipité (1)	34	120	223	350	416	420
Proportion d'acide nucléique précipité p. 100	4,6	16,3	31	48	56,6	58

(1) Phosphore en microgrammes dans le précipité pour 1 ml de solution initiale.

indique les quantités de précipité obtenu avec des volumes croissants d'acide acétique ajouté à un même volume d'acide nucléique. Les précipités sont recueillis par centrifugation après une heure de contact à la température du laboratoire. Leurs quantités sont appréciées par leurs teneurs en phosphore (méthode de Macheboeuf et Delsal [5]).

Nous constatons que la proportion de précipité par rapport

à la quantité totale d'acide nucléique tend vers une limite qui est pratiquement atteinte pour 20 volumes d'acide acétique. Ce phénomène est un fait général qui s'observe quel que soit le degré de polydispersion de l'acide ribonucléique utilisé.

Nous avons pensé qu'il s'agissait d'une précipitation fractionnée. Les données numériques que nous apportons sont les résultats d'expérimentation sur un autre échantillon d'acide nucléique (N_2) dissous dans un tampon phthalate de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml :

a) Les précipités obtenus par un volume d'acide acétique, par

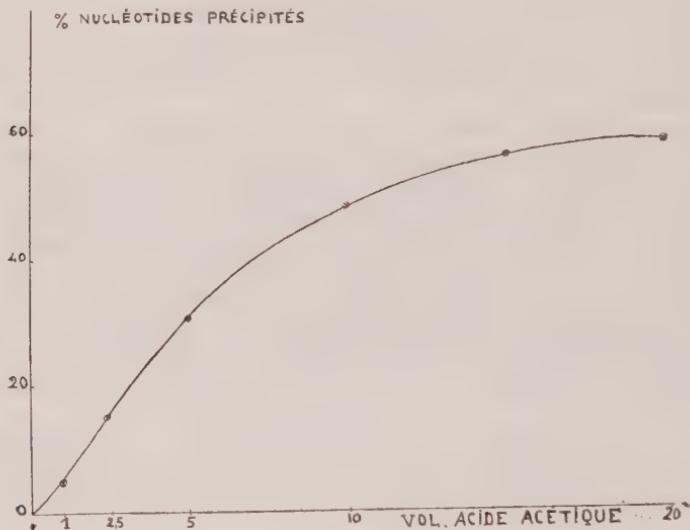


FIG. 1.

exemple, sont nettement plus riches en phosphore que l'acide ribonucléique initial qui contient à la fois nucléotides et nucléosides.

b) Des précipitations effectuées, l'une par 1 volume et l'autre par 20 volumes d'acide acétique fournissent des précipités dont les teneurs respectives en phosphore : P_1 et P_2 sont :

Si nous recueillons le liquide surnageant après précipitation par 1 volume d'acide acétique et si nous lui ajoutons 19 volumes d'acide acétique, nous obtenons un deuxième précipité dont la teneur en phosphore (393 microgrammes) est pratiquement égale à P_2-P_1 , ce qui constitue un bon contrôle.

c) Les fractions isolées par précipitation fractionnée, puis préparées à l'état de leur sel de sodium, présentent des solubilités dans l'eau différentes : les fractions les moins solubles correspondent à celles isolées par de faibles quantités d'acide acétique.

La précipitation fractionnée par l'acide acétique est donc susceptible de rendre compte des différents états de polymérisation d'un acide nucléique.

Par la suite, nous appellerons « hauts polymères » (H. P.) la fraction précipitable par 1 volume d'acide acétique, et « moyens polymères » (M. P.) la fraction précipitable entre 1 et 20 volumes d'acide acétique, laissant la désignation de « petits polymères » (P. P.) aux nucléotides solubles dans 20 volumes d'acide acétique. Notons que la solution-mère des « moyens polymères » peut contenir non seulement les « petits polymères », mais en outre des nucléosides. Il ne faut donc considérer comme « petits polymères » que la fraction soluble dans 20 volumes d'acide acétique et précipitable par l'acétate d'uranyle en solution acide [6, 7].

La méthode de précipitation fractionnée par l'acide acétique nous a permis d'aborder l'étude cinétique de l'action de la ribonucléase sur l'acide ribonucléique grâce aux variations, au cours du temps, des hauts et moyens polymères.

La ribonucléase fut préparée suivant la méthode de Kunitz [8, 9], à partir de pancréas de Bœuf. L'extrait obtenu par l'acide sulfurique N/4 est précipité par le sulfate d'ammonium entre 0,7 et 0,8 de saturation. Après dialyse contre de l'eau bidistillée, la ribonucléase est traitée par l'alcool à 90° et obtenue ainsi sous sa forme cristallisée. Les cristaux sont remis en solution aqueuse. La solution est finalement évaporée sous vide à très basse température (lyophilisation).

Nous avons vérifié l'homogénéité de cette ribonucléase grâce à l'étude de sa mobilité par électrorhéophorèse (figure 1 a). Par ultracentrifugation (figure 1 b), nous n'avons pas non plus décelé de protéines étrangères (1).

La ribonucléase est mise en présence d'acide nucléique de levure dans les conditions suivantes :

1,25.10⁻³ mg de ribonucléase pour 1 ml de solution d'A. R. N. L'A. R. N. (échantillon N₃) a été dissous dans le tampon phtalate 0,2 M de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml.

Nous avons suivi l'hydrolyse en fonction du temps par des dosages de phosphore dans les précipités obtenus pour des proportions diverses d'acide acétique. Les chiffres du tableau II

(1) Nous tenons à remercier notre ami P. Slizewicz, qui a réalisé cette ultracentrifugation.

représentent les quantités de phosphore en microgrammes dans les H. P. et M. P. provenant de 7,5 mg d'A. R. N.

Nous constatons qu'après trente minutes d'hydrolyse, les hauts



FIG. 4 a.



FIG. 4 b.

TABLEAU II.

TEMPS ÉCOULÉ depuis le début de l'hydrolyse en minutes	PHOSPHORE en microgr. (H. P.)	VARIATION p. 100 (H. P.)	PHOSPHORE en microgr. (M. P.)	VARIATION p. 100 (M. P.)
0	82	0	378	0
30.	29	— 64,5	237	— 37,3
120.	20	— 75	143	— 62
240.	19	— 76,8	123	— 67,4

polymères ont disparu dans la proportion de 64,5 p. 100 et les moyens dans la proportion de 37,3 p. 100.

L'hydrolyse des grands polymères évolue donc plus rapidement que celle des moyens polymères.

Pour confirmer ces premiers résultats, nous avons étudié l'action

de la ribonucléase à des dilutions plus grandes (tableau III) : 10^{-6} mg/ml.

Dans cette expérience, la proportion de ribonucléase est très

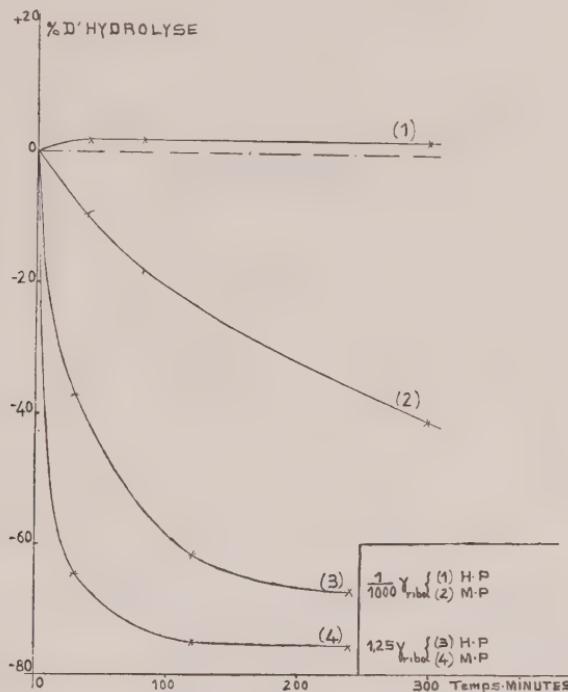


FIG. 2.

TABLEAU III.

TEMPS ÉCOULÉ depuis le début de l'hydrolyse en minutes	PHOSPHORE en microgr. (H. P.)	VARIATION p. 100 (H. P.)	PHOSPHORE en microgr. (M. P.)	VARIATION p. 100 (M. P.)
0.	82	0	378	0
20.	75	- 8,5	385	+ 2
80.	67	- 18,3	383	+ 2
300.	48	- 41,4	385	+ 2

faible et l'hydrolyse progresse très lentement. Nous pouvons ainsi mettre en évidence :

- 1° Une diminution de la proportion des hauts polymères ;
- 2° Une faible augmentation initiale des moyens polymères qui,

d'ailleurs, atteint très vite un maximum. (Si on prolonge l'expérience, les moyens polymères diminuent à leur tour.)

On peut penser que les hauts polymères fournissent dans un premier temps des moyens polymères. Ces derniers, à leur tour, subissent l'hydrolyse enzymatique. Pendant un certain temps, la teneur en moyens polymères reste constante, car la quantité qui se détruit est à peu près équivalente à la quantité qui prend naissance à partir des hauts polymères.

Après une hydrolyse très prolongée, il reste encore des hauts et moyens polymères. L'hydrolyse tend donc vers une limite. Ces faits mettent en évidence l'existence, dans les produits d'hydrolyse, de polynucléotides d'un degré de polymérisation assez élevé (insolubles dans l'acide acétique) résistants à la ribonucléase.

En résumé, il est possible, grâce à la précipitation fractionnée par l'acide acétique, d'apprécier une différence entre les vitesses d'action de la ribonucléase sur les fractions d'acide ribonucléique de divers poids moléculaires. Les fractions de plus haut poids moléculaire sont attaquées plus rapidement ; mais il persiste toujours une certaine proportion de hauts polymères qui se montre résistante à l'action de la ribonucléase.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. CHANTRENNE. *Bull. Soc. chim. Belge*, 1946, **55**, 5.
- [2] J. M. GHUYSEN. *Bull. Soc. chim. Belge*, 1950, **59**, 490.
- [3] L. VANDENDRIESSCHE. *C. R. Lab. Carlsberg*, 1951, **27**, 342.
- [4] M. G. SEVAG. *J. Biol. Chem.* 1938, **124**, 425.
- [5] M. MACHEBOËUF et J. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 116.
- [6] McFEYDEN. *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 297.
- [7] Ch. ZITTLE. *J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, 119.
- [8] M. KUNITZ. *Science*, 1939, **112**, 113.
- [9] M. KUNITZ. *J. gen. Physiol.*, 1940, **24**, 15.

ÉTUDE DE LA GLYCOLYSE CHEZ CERTAINES BACTÉRIES DU GENRE *BACILLUS*

I. — DÉSHYDROGÉNASES DU GLUCOSE-6-PHOSPHATE ET DE L'ACIDE 6-PHOSPHOGLUCONIQUE CHEZ *B. SUBTILIS* ET *B. MEGATHERIUM* (*.)

par R. DEDONDER (1).

(Avec l'assistance technique de M^{me} C. NOBLESSE.)

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Nos connaissances sur les premiers stades de la dégradation du glucose par les bactéries sont encore très fragmentaires et mettent cependant en évidence la multiplicité des moyens employés par divers microorganismes.

Malgré de nombreux travaux mettant en évidence l'existence, chez des bactéries dégradant le glucose, de produits phosphorylés appartenant à la voie d'Embden-Meyerhof, l'existence de celle-ci n'a pas été clairement démontrée [1, 2, 3, 4, 5]. Dans le genre *Bacillus*, Stone et Werkman [6] ont montré la formation d'acide phosphoglycérique au cours de la dégradation du glucose par *B. subtilis*, en quantité extrêmement faible, surtout par rapport à la méthode employée. Heitzmann [8] n'a pu trouver de glycolyse phosphorylante chez *B. megatherium*.

Cependant, MacNair Scott et Cohen [9] chez *E. coli*, puis De Ley et Cornut [10] chez *Aerobacter* sp. ont montré l'existence des déshydrogénases du glucose-6-phosphate et de l'acide 6-phosphogluconique et la production de pentoses-phosphates, retrouvant ainsi chez ces microorganismes aérobies facultatifs la voie oxydative de Warburg-Dickens. Des travaux de Racker [11], de Horecker et Smyrmotis [12], de Marmur et Schlenk [13], ont montré que les pentoses-phosphates pouvaient être métabolisés par diverses bactéries dont *E. coli*.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1953.

(1) Communication présentée au II^e Congrès International de Biochimie, Paris, juillet 1952.

Entner et Doudoroff [14] ont trouvé chez *Pseudomonas saccharophila* une variante de cette voie : le glucose-6-phosphate est bien oxydé en acide 6-phosphogluconique mais celui-ci, au lieu d'être décarboxylé oxydativement en pentose-phosphate, est scindé en deux morceaux en C_3 .

Cependant le glucose peut aussi être oxydé directement sans phosphorylation. Stokes et Campbell [15] ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* transformait le glucose en acide gluconique et cétogluconique sans intervention du phosphore.

De même *Neisseria winogradskyi* transforme le glucose en acide gluconique (Lemoigne et Croson [16]) ; Aubert, Milhaud et Gavard [17] ont extrait de ce microbe le système enzymatique responsable, non phosphorylant et qui n'est ni la notatine, ni le système de Harrison.

Il nous a paru intéressant de rechercher comment des bactéries du genre *Bacillus*, aérobies stricts et croissant activement sur glucose, se comportaient.

Cette première note porte sur la mise en évidence chez *B. subtilis* et *B. megatherium* du système glucose-6-phosphate déshydrogénase, acide 6-phosphogluconique déshydrogénase et montre l'existence de la voie de glycolyse oxydative de Warburg-Dickens chez ces bactéries.

PRODUITS ET MÉTHODES.

Le glucose 6-phosphate a été préparé à partir de l'ester d'Embden par la méthode de Le Page et Umbreit [4].

Le 6-phosphogluconate est préparé à partir du glucose-6-phosphate par la méthode de Segmiller et Horecker [18].

L'hexose diphosphate est préparé selon Neuberg et Lustig [19], purifié selon Neuberg et Sabetay [20], puis par précipitation du sel acide à pH 3,8 (Meyerhof et Junowicz-Kocholaty [21] ; 90 p. 100 sont transformés en trioses-phosphates en présence d'aldolase.

Le ribose-phosphate est préparé par hydrolyse du sel de baryum de l'adénosine triphosphate selon Levene et Jacobs [22].

Les coenzymes I et II ont été préparés par M. Peaud-Lenoël à l'obligeance de qui nous les devons. Le coenzyme I titre 50 p. 100, le coenzyme II (TPN) 37 p. 100.

MÉTHODES.

Nous avons suivi les respirations des bactéries au *resting* par la méthode manométrique de Warburg.

Nous avons étudié les activités déshydrogénasiques d'une part, par la méthode de Friedmann et Hollander [23], d'autre part,

en suivant la réduction des coenzymes par leur absorption à 340 m μ au spectrophotomètre de Beckman.

Nous avons enfin utilisé le bleu de crésyl brillant comme transporteur pour suivre l'oxydation du glucose-6-phosphate et du phosphogluconate par les extraits et caractériser les pentoses formés.

La caractérisation et le dosage des pentoses ont été effectués par la méthode de Brown [24].

CULTURES ET EXTRAITS.

Nous avons utilisé une souche de *B. subtilis* (BG 2 F₁) de la collection de M^{le} Delaporte et une souche de *B. megatherium* (M.L.). Les cultures sont faites en Erlenmeyers agités sur milieu synthétique avec glucose (Grelet [25]). La récolte est faite après vingt-quatre heures, les bacilles, centrifugés à la Sharples, sont lavés par 2 agitations successives avec une solution de C1K à 9 g p. 1 000 pendant quinze minutes au froid, suivies de centrifugation. On prépare des suspensions contenant environ 3 mg de matière sèche par millilitre.

Les extraits sont obtenus par broyage du culot de bactéries lavées avec de la poudre de quartz dans un mortier à 0°. Le broyat est repris par une solution tampon phosphate 0,025 M, pH 7,4. On centrifuge trente minutes jusqu'à sémination des bactéries. On obtient alors un extrait ne contenant plus de bactéries mais des granules en suspension (extrait brut : B). On peut le recentrifuger (vingt minutes dans une Serval). On obtient alors une solution jaune très légèrement opalescente qui est l'extrait proprement dit E et un culot. Dans certains cas nous avons rebroyé et réextracté ce culot (extrait C). Les extraits B et E sont dialysés, avant l'emploi, une nuit à 0° contre du tampon phosphate pH 7,4, 0,025 M en dialyse agitée.

I. — RESPIRATION DES SUSPENSIONS DE BACILLES LAVÉS.

On opère en général avec 0,5 ml de suspension que l'on fait agir sur 40 μ M de substrat.

Les courbes (fig. 1 et 2) montrent les résultats obtenus.

1^o Le gluconate est consommé à la même vitesse que le glucose, mais après un temps de latence que l'on retrouve toujours et qui peut être attribué à la nécessité de la formation d'une kinase adaptative.

2^o A pH 6,5 le glucose-6-phosphate et le phosphogluconate sont consommés presque aussi rapidement que le glucose. L'hexose diphosphate n'augmente pas la respiration propre (quelle que soit la valeur du pH).

Nous avons réuni sur les courbes de la fig. 3 les valeurs des quotients respiratoires CO_2/O_2 en fonction de l'oxygène consommé.

Toutes ces valeurs sont établies, déduction faite de la courbe de respiration propre.

On voit que sur gluconate et phosphogluconate le quotient

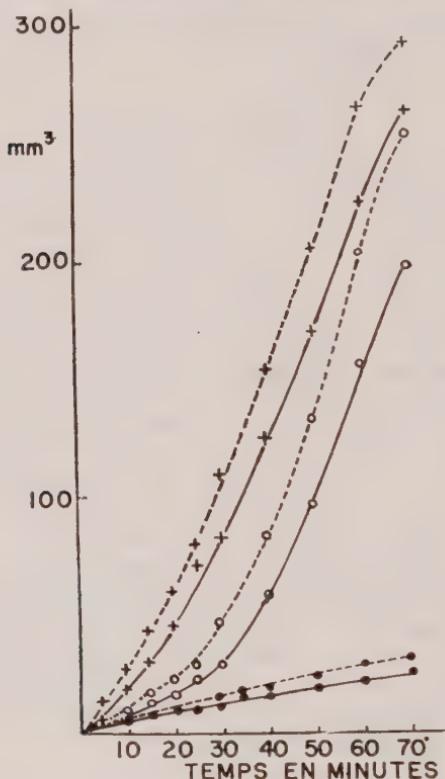


FIG. 1. — Respiration par une suspension de bactéries lavées (B.G.) sur glucose et gluconate. Trait plein : O_2 . Tirets : CO_2 ; +, glucose; o, gluconate; •, respiration propre. Substrat 40 μM (0,016 M). Phosphate pH 6,5 0,032 M, MgCl_2 , 0,008 M. Bactéries : 15 mg matière sèche.

respiratoire est beaucoup plus grand au départ et baisse jusqu'à une valeur normalement un peu supérieure à celle obtenue avec glucose et glucose-6-phosphate. On peut en déduire une rapide libération de CO_2 au début de la respiration.

A la fin de la respirométrie on centrifuge les microbes et on dose les pentoses sur 0,1 cm^3 par la méthode de Brown. En raison de l'excès énorme de substrat, les résultats n'ont qu'une valeur qualitative. Le tableau I montre les valeurs obtenues au

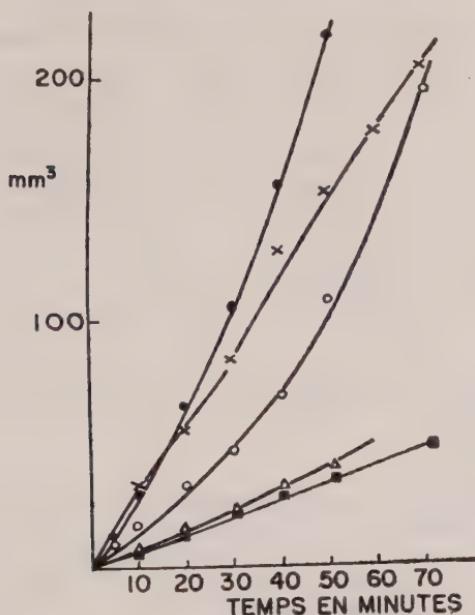


FIG. 2. — Consommation d' O_2 au Warburg par une suspension de bactéries lavées (B. G.) sur divers substrats. Concentrations, voir figure 1. ., glucose; x, phosphogluconate; o, glucose-6-phosphate; ■, hexosediphosphate; Δ , respiration propre.

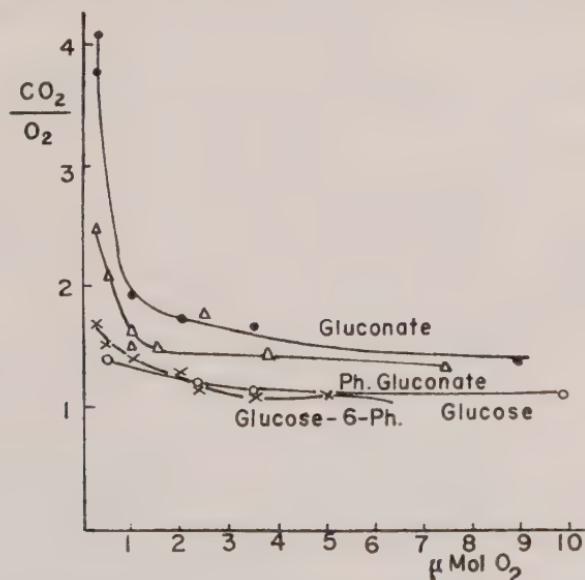


FIG. 3. — Variations du quotient respiratoire CO_2/O_2 de suspensions de *B. subtilis* sur divers substrats.

TABLEAU I. — Formation de Pentoses au cours de la respiration de suspension de *B. subtilis* en fioles de Warburg.

Substrat initial 40 μ M. Arrêt après cent vingt minutes après consommation de 5 μ M O_2 sur glucose. Dosage sur 0,1 cm³ du mélange après centrifugation des microbes. Témoin sur le contenu des fioles au temps 0.

SUBSTRATS	6-PHOSPHO-GLUCONATE		GLUCONATE		GLUCOSE-6-PHOSPHATE		GLUCOSE	
Lecture (Coleman), longueur d'onde	670	520	670	520	670	520	670	520
120 minutes	41	52	3,5	9,0	54	57	28,5	38
0 minute	22	49	4,0	15,2	36	74	30,5	57,5
Pentoses { 120 minutes en μ g.	105	17,5	0	0	187	0	70	7,5
Pentoses formés en μ M	0,58		0		1,2		0,42	

cours d'une expérience. Il y a formation de pentoses, faible mais nette dans les fioles contenant au départ du glucose, du glucose-6-phosphate et du 6-phosphogluconate.

II. — ACTIVITÉS DÉSHYDROGÉNASIQUES DES EXTRAITS.

Nous avons d'abord testé l'activité des extraits de *B. subtilis* par la méthode de Friedmann et Hollander en absence de

TABLEAU II.

SUBSTRATS	O			GLUCOSE			GLUCONATE		
	O	I	II	O	I	II	O	I	II
Coenzymes	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Extrait B 0,5 ml . . .	> 12'	9'	9'	> 12'	6'	6'	> 12'	12'	9'
Extrait E 0,4 ml . . .	90'	60'	70'	90'	60'	60'			
Extrait E 0,4 ml + extrait C 0,5 ml . . .	> 70'	60'	6'	> 70'	60'	4'			
SUBSTRATS	GLUCOSE-6-PHOSPHATE			6-PHOSPHO-GLUCONATE			H. D. P.		
Coenzymes	O	I	II	O	I	II	O	I	II
Extrait B 0,5 ml . . .	> 12'	12'	< 1'	> 12'	9'	< 1'	> 12'	6'	6'
Extrait E 0,4 ml . . .	90'	60'	4'	> 90'	40'	4'	90'	60'	40'
Extrait E 0,4 ml + extrait C 0,5 ml . . .	> 70'	60'	< 1'				70'	60'	2'

coenzyme ou en présence du coenzyme I ou du coenzyme II. Le tableau II résume les résultats obtenus.

Son examen montre l'existence d'une très importante activité de déshydrogénéation sur le glucose-6-phosphate et le phosphogluconate, TNP dépendante.

Les déshydrogénations qui s'exercent aux dépens de l'hexose diphosphate, du ribose-phosphate ou du glucose sont beaucoup moins nettes et se différencient peu de ce qui se passe sans substrat.

Les résultats de la dernière ligne montrent que l'addition de l'extrait C fait à partir de granules provoque une réduction du bleu dans les tubes à TPN.

Il est vraisemblable que ces granules contiennent une substance qui est déshydrogénée par l'extrait surnageant en présence de TPN.

ETUDE DES ACTIVITÉS DE DÉSHYDROGÉNATION DU GLUCOSE-6-PHOSPHATE ET DU PHOSPHOGLUCONATE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE.

Nous avons suivi au spectrophotomètre de Beckman la réduction des coenzymes par les extraits (surnageants) de *B. subtilis* en présence de glucose-6-phosphate ou de phosphogluconate.

Les courbes (fig. 4) montrent les résultats obtenus en suivant l'augmentation de densité optique à 340 m μ . Elles montrent qu'avec un excès de glucose-6-phosphate on arrive à la réduction presque totale du Co II mis en jeu. Si l'on diminue la quantité d'extrait on arrive à la courbe III qui donne, selon la terminologie d'Horecker et Smyrniotis [26] (1 unité d'enzyme = quantité qui produit un changement de densité de 1,0 par minute), 0,6 unité par milligramme de protéine dans l'extrait brut (protéines calculées sur la base de l'azote Kjeldahl).

L'activité sur le phosphogluconate est beaucoup plus faible et peut être évaluée dans les mêmes unités à 0,15 unité par milligramme de protéines. Dans les conditions expérimentales, la réaction n'est pas totale. Rappelons pour comparaison que Horecker et Smyrniotis trouvent dans l'extrait brut de levure 0,3 unité par milligramme de protéines pour la déshydrogénase de l'acide phosphogluconique. Mg⁺⁺ est indispensable, mais l'addition de glycocolle ou le remplacement du tampon phosphate par un tampon glycylglycine ralentissent la réaction.

Nous avons testé de la même manière l'activité de l'extrait de *B. megatherium* sur glucose-6-phosphate en présence de TPN au spectrophotomètre de Beckman.

La première expérience faite avec 0,2 ml de la solution de

TPN à 2 mg par millilitre montre une faible augmentation de la densité optique par rapport à la quantité de TPN mise en jeu.

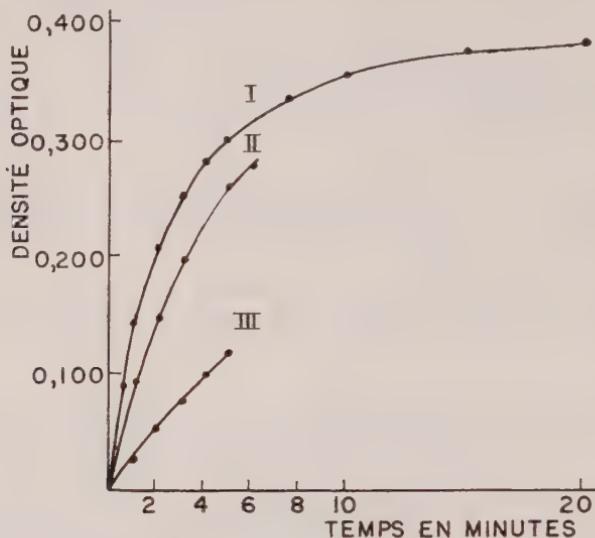


FIG. 4.5. — Réduction du TPN par l'extrait de *B. subtilis* (B.G.) en présence de glucose-6-phosphate. Substrat 10 μ M; concentration 0,033 M. Phosphate pH 7,4, 0,066 M. TPN 0,2 ml solution à 2 mg/ml dans les 3 ml. Courbe 1 0,5 ml extrait dilué quatre fois. Courbe 2 : 0,2 ml extrait dilué quatre fois. Courbe 3 : 0,2 ml extrait dilué vingt fois.

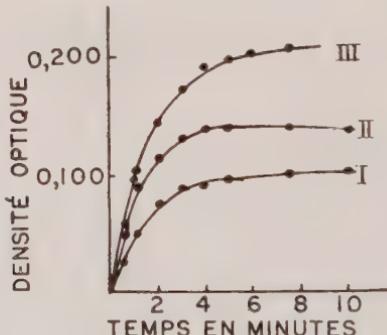


FIG. 5. — Réduction du TPN par l'extrait de *B. megatherium* (ML.) en présence de glucose-6-phosphate. Substrat 10 μ M. Concentration 0,033 M. Phosphate pH 7,4, 0,066 M. TPN 0,2 ml, solution à 2 mg/ml. Extrait 0,5 ml. Courbe 1 : sans addition. Courbe 2 : glycocolle 0,025 M, $MgCl_2$ 0,005 M. Courbe 3 : glycocolle 0,08 M, $MgCl_2$ 0,01 M.

L'addition de glycocolle et de $MgCl_2$ produit une augmentation importante de la réduction du TPN.

Dans une deuxième série d'expériences, l'influence de ces facteurs a été étudiée. $MgCl_2$ 0,010 et glycocolle 0,08 M semblent des quantités proches de l'optimum (fig. 5).

Dans les conditions de ces expériences il est difficile de déterminer l'activité ; on peut seulement dire qu'elle est supérieure à 0,21 unité par milligramme de protéines.

Le 6-phosphogluconate est aussi déshydrogéné ; dans les conditions optima on n'observe qu'une réduction partielle du TPN comme pour l'extrait de *B. subtilis*.

Dans tous ces essais, le remplacement du TPN par le coenzyme I donne des résultats totalement négatifs.

III. — OXYDATION DU GLUCOSE-6-PHOSPHATE
ET DU PHOSPHOGLUCONATE AU WARBURG
PAR LES EXTRAITS DE *B. subtilis*
AVEC L'AIDE DE BLEU DE CRÉSYL BRILLANT.

On part d'un extrait centrifugé de *B. subtilis* que l'on fait agir dans des fioles manométriques de Warburg sur 10 μ mol.

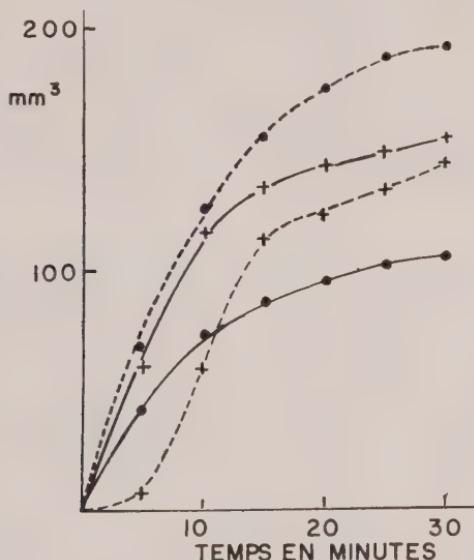


FIG. 6. — Oxydation du glucose-6-phosphate et du 6-phosphogluconate par les extraits de *B. subtilis* 10 μ M de substrat, concentration 0,004 M. Phosphate pH 7,4, 0,001 M. TPN 0,1 mg par cupule. $MgCl_2$ 0,008 M. Bleu crésyl brillant, 1 mg par cupule. Extrait 0,5 ml. Température, 37°. Trait plein : O_2 . Tirets : CO_2 .

de glucose-6-phosphate ou de 6-phosphogluconate. Les conditions expérimentales sont résumées dans la légende de la figure 6.

Nous avons, après arrêt de la réaction, éliminé le bleu et déféréqué les milieux de réactions à l'aide de la résine échangeur de cations Amberlite 1 R 100 et nous avons dosé les pentoses sur le liquide incolore et clair obtenu.

La figure 6 montre les courbes d'échanges gazeux et le tableau III résume les résultats.

TABLEAU III.

SUBSTRAT	SUBSTRAT μ M.	O ₂ CONSUMMÉ		CO ₂ FORMÉ		CO ₂ /O ₂	PENTOSES μ M.
		mm ³	μ M.	mm ³	μ M.		
O							0,5
Glucose 6-Ph.	10	156	7	145	6,5	0,93	6,9
6 Ph. gluconate . . .	10	105	4,6	198	8,9	1,9	6,3

Pour le glucose-6-phosphate, la valeur 0,93 du rapport CO₂/O₂ est satisfaisante par rapport à la réaction :

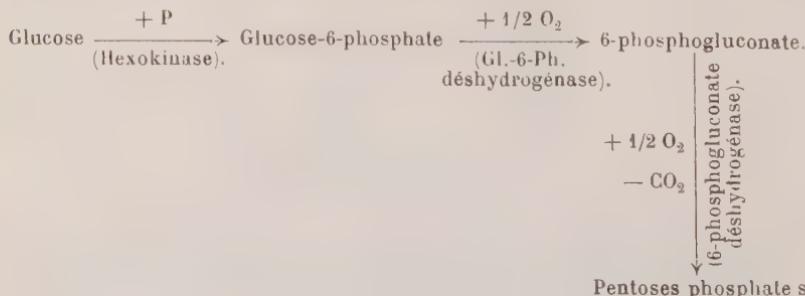


Dans le cas du phosphogluconate, CO₂/O₂ est égal à 1,9 très proche de 2, valeur théorique qui correspond à la réaction.



CONCLUSIONS.

Ces résultats montrent l'existence chez les deux bactéries étudiées des déshydrogénases du glucose-6-phosphate et de l'acide 6-phosphogluconique. Ils peuvent donc oxyder le glucose par la voie oxydative de Warburg-Dickens.



Nota. — Dans une autre série d'expériences que nous publierons ultérieurement, nous avons observé la formation du glucose-6-phosphate à partir du glucose, ce qui nous permet d'écrire ici le premier maillon de la chaîne.

Nous ne pouvons affirmer qu'elle soit la seule utilisée. Cependant nous pensons qu'elle a un rôle physiologique important d'après les résultats des respirométries.

L'existence du quotient respiratoire, très élevé au début pour le gluconate et le 6-phosphogluconate, nous fait penser qu'il y a une réaction de décarboxylation rapide de ces substrats pour donner les pentoses phosphates.

C'est sans doute à cela que l'on doit de pouvoir mettre en évidence de petites quantités de pentoses. Le fait que l'on puisse voir aussi des pentoses lorsque le substrat est le glucose, nous incline à croire qu'au moins une partie non négligeable de glucose est effectivement oxydée par cette voie.

Il est intéressant de constater l'existence fonctionnelle de cette voie oxydative et phosphorylante chez des bactéries aérobies croissant activement sur glucose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. VIRTANIEN et J. TIKKA. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **228**, 407.
- [2] CL. FROMAGEOT et R. SAFAVI. *Enzymologia*, 1939, **6**, 57.
- [3] R. J. MANNING. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 349.
- [4] G. A. LE PAGE et W. UMBREIT. *J. Biol. Chem.*, 1943, **147**, 263.
- [5] R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1716.
- [6] R. W. STONE et C. H. WERKMAN. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1516.
- [7] HEITZMANN. Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 1942.
- [8] D. B. MACNAIR, SCOTT et S. S. COHEN. *J. Biol. Chem.*, 1951, **188**, 509.
- [9] J. DE LEY et S. CORNUT. *Nature*, 1951, **168**, 515.
- [10] E. RACKER. *J. Biol. Chem.*, 1952, **196**, 947.
- [11] B. L. HORECKER. II^e Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, p. 292.
- [12] J. MARMUR et F. SCHLENK. *Arch. Bioch. et Biophys.*, 1951, **31**, 154.
- [13] N. ENTNER et M. DOUDOROFF. *J. Biol. Chem.*, 1952, **196**, 853.
- [14] F. N. STOKES et J. J. R. CAMPBELL. *Arch. Biochem.*, 1951, **31**, 121.
- [15] M. LEMOIGNE et M. CROSON. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1075.
- [16] J.-P. AUBERT, G. MILHAUD et R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1165.
- [17] J. E. SEG MILLER et B. L. HORECKER. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 175.
- [18] C. NEUBERG et H. LUSTIG. *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 2722.
- [19] C. NEUBERG et SABETAY. *Biochem. Zeitschr.*, 1925, **161**, 240.
- [20] O. MEYERHOF et R. JUNOWICZ-KOCHOLATY. *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 71.
- [21] P. A. LEVENE et W. A. JACOBS. *Ber.*, 1911, **44**, 746.
- [22] U. FRIEDMANN et A. HOLLANDER. *J. Lab. Clin. Med.*, 1942, **28**, 353, in *Manometric Techniques*, Umbreit, Burris et Stauffer (Burgess), p. 108.
- [23] A. H. BROWN. *Arch. Biochem.*, 1946, **11**, 269.
- [24] N. GRELET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 430.
- [25] B. L. HORECKER et P. Z. SMYRNIOTIS. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 371.

TITRAGE DU POUVOIR AMMONIFIANT DE LA MICROFLORE DES SOLS

par H. DE BARJAC et J. POCHON (*).

(*Institut Pasteur. Service de Microbie Technique.
Laboratoire de Microbiologie du Sol.*)

Le pouvoir ammonifiant représente l'une des caractéristiques principales d'une terre. Or son titrage est rendu difficile par la nature même de l'ammoniac dont la volatilité et la capacité de fixation sur la terre (sans compter sa réutilisation immédiate par la microflore) empêchent toute mesure rigoureuse. Nous proposons ici une méthode basée non plus sur le titrage du dégagement d'ammoniac, mais sur celui de la disparition du substrat, source de cet ammoniac. Ce substrat devait représenter un constituant type des protéines, et être suffisamment répandu pour que son attaque ait une portée assez générale. Il devait, en outre, être de structure simple, facile à caractériser par une réaction chimique d'une spécificité et d'une sensibilité satisfaisantes. Ces conditions ont guidé notre choix vers la tyrosine.

Pour éprouver le bien-fondé de ce choix, nous avons, dans un premier temps, vérifié la valeur de la tyrosine en faisant un essai comparatif avec la méthode de Pochon et Tchan [1]. Cet essai fut effectué sur une terre témoin (TP2 des jardins de l'Institut Pasteur), en terre et en sable suivant le mode décrit par ces auteurs, d'une part avec du sang, d'autre part, avec de la tyrosine. Dans les deux cas, on observe un parallélisme des courbes, ce qui prouve que la tyrosine, comme le sang, donne lieu à un phénomène d'ammonification, se traduisant de manière identique. En effet, les courbes de dégagement d'ammoniac obtenues avec la tyrosine présentent une phase ascendante, un apex au 4^e jour et une phase descendante atteignant son minimum au 12^e jour.

La valeur de la tyrosine ayant ainsi été établie, nous avons mis au point la méthode dont la description suit.

TECHNIQUE.

Principe. — Ensemencement d'un milieu à base de tyrosine par des dilutions de terre et lecture quotidienne de la disparition de la tyrosine.

(*) Société de Microbiologie. Séance du 5 février 1953.

Milieu. — Tyrosine, 0,5 g ; solution de Winogradsky, 50 ml ; eau de Seine q. s. p. 1 000. La solution est stérilisée par filtration sur bougie et répartie en tubes stériles, à raison de 5 ml par tube.

ensemencement. — La terre à examiner est broyée finement en mortier stérile, puis soigneusement mélangée à de l'eau de Seine stérile, de façon à réaliser une gamme de dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} . Chaque dilution sert à ensemencer, à raison de 1 ml par tube, 12 tubes du milieu. Etuve à 28°.

Nous avons fait cette expérience sur 5 terres choisies très différentes.

TP2 : terre témoin (jardins de l'Institut Pasteur), pH = 7,2.

O1 : terre d'oliveraie, pH = 8,5.

SeVB. : terre à culture de seigle (Bretagne), pH = 5,2.

L3 : terre de tourbière acide (forêt de Rambouillet), pH = 4.

Ar : terre de pinède (Haute-Loire), pH = 5,2.

Lecture. — Quotidiennement : recherche de la tyrosine par le réactif de Millon : 2 ml de chaque tube + IV gouttes de réactif + X gouttes d'acide acétique. Bain-marie 40°, trente minutes. Coloration variant du rouge vif au rose pâle, suivant la quantité de tyrosine, et pouvant faire l'objet d'un dosage colorimétrique, comme nous verrons plus loin. Il nous a, en outre, paru intéressant de rechercher et de suivre le dégagement de NH₃, afin de prouver que le catabolisme de la tyrosine se traduisait bien par une libération de sa fonction amine sous forme de NH₃, dans ce milieu liquide comme dans les milieux terre et sable. Nous avons donc, sur les 3 ml restants de chaque tube, recherché la présence de NH₃ par la formation d'iodure d'azote (X gouttes d'IK 10 p. 100 + V gouttes de ClONa concentré, coloration noire très fugace, à lire au moment même de l'addition d'hypochlorite).

RÉSULTATS.

Les résultats sont groupés dans les deux tableaux suivants.

Les différences de comportement entre les 5 terres apparaissent clairement dans la représentation graphique (fig. 1) de ces tableaux.

Les courbes permettent de constater l'extrême activité du témoin TP2 relativement aux autres terres. Le 7^e jour il ne reste plus trace de tyrosine, dans aucune dilution de TP2, alors que les terres O1 et SeVB en renferment encore dans les dilutions les plus poussées, au 12^e jour ; même au 23^e jour, on peut mettre encore en évidence cette tyrosine, dans les terres L3 et Ar. Le pouvoir ammonifiant de ces cinq microflores apparaît ainsi d'une intensité bien différente.

Le classement des terres par ordre de pouvoir ammonifiant décroissant donne : TP2 > O1 > SeVB > Ar > L3. C'est

TABLEAU I. — Recherche de la tyrosine.

Dilutions	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
Jours	2	-	-	-	ε	++	++	++
	3	-	-	-	ε	ε	+	++
	4	-	-	-	-	ε	+	+
	5	-	-	-	-	-	ε	ε
	6	-	-	-	-	-	ε	-
	7	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-
T P 2								
Jours	2	ε	ε	ε	++	++	++	++
	3	-	ε	ε	++	++	++	++
	4	-	-	ε	++	++	++	++
	5	-	-	-	++	++	++	++
	6	-	-	-	ε	+	+	+
	7	-	-	-	-	ε	ε	ε
	8	-	-	-	-	ε	ε	ε
	10	-	-	-	-	ε	ε	ε
	11	-	-	-	-	-	-	+
	12	-	-	-	-	-	-	ε
	23	-	-	-	-	-	-	-
01								
Jours	2	ε	ε	+	++	++	++	++
	3	-	-	ε	ε	++	++	++
	4	-	-	ε	+	++	++	++
	5	-	-	-	+	++	++	++
	6	-	-	-	ε	ε	++	++
	7	-	-	-	ε	++	++	++
	8	-	-	-	-	++	++	++
	9	-	-	-	-	++	++	++
	10	-	-	-	-	++	++	++
	11	-	-	-	-	ε	+	+
	12	-	-	-	-	ε	+	+
	23	-	-	-	-	ε	-	-
Se V B								
Jours	2	ε	++	++	++	++	++	++
	3	ε	++	++	++	++	++	++
	4	-	+	+	+	++	++	++
	5	-	-	+	+	++	++	++
	6	-	-	ε	ε	++	++	++
	7	-	-	-	+	++	++	++
	8	-	-	-	+	++	++	++
	9	-	-	-	+	++	++	++
	10	-	-	-	-	++	++	++
	11	-	-	-	-	ε	+	+
	12	-	-	-	-	ε	+	+
	23	-	-	-	-	ε	-	-
L 3								
Jours	2	ε	++	++	++	++	++	++
	3	ε	++	++	++	++	++	++
	4	-	+	+	+	++	++	++
	5	-	ε	+	+	++	++	++
	6	-	ε	ε	ε	++	++	++
	7	-	-	-	+	++	++	++
	8	-	-	-	+	++	++	++
	9	-	-	-	+	++	++	++
	10	-	-	-	+	++	++	++
	11	-	-	-	+	++	++	++
	12	-	-	-	ε	+	+	+
	23	-	-	-	ε	+	+	+
A 2								
Jours	2	++	++	++	++	++	++	++
	3	-	++	++	++	++	++	++
	4	-	ε	+	+	++	++	++
	5	-	ε	+	+	++	++	++
	6	-	-	ε	+	++	++	++
	7	-	-	ε	++	++	++	++
	8	-	-	ε	ε	++	++	++
	9	-	-	-	ε	++	++	++
	10	-	-	-	ε	++	++	++
	11	-	-	-	ε	++	++	++
	12	-	-	-	ε	+	+	++
	23	-	-	-	-	-	-	ε

également l'ordre apparent de fertilité de ces terres, ce qui vérifie une fois de plus que le pouvoir ammonifiant est l'un des

TABLEAU II. — Recherche de l'ammoniac.

Dilutions	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
Jours	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	ε	ε	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	ε	ε	ε	ε
	5	+	+	+	ε	ε	ε	ε
	6	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	ε	+
	8	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+
	I2	+	+	+	+	+	+	+
T P 2								
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	ε	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	ε	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	+	ε	-	-
	7	+	+	+	+	+	ε	-
	8	+	+	+	+	+	+	-
	9	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+
	I2	+	+	+	+	+	+	+
O1								
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	ε	-	-
	7	+	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	+	+	ε	-
	9	+	+	+	+	+	-	-
	10	+	+	+	+	+	ε	-
	II	+	+	+	+	+	-	-
	I2	+	+	+	+	+	ε	-
S e V B								
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	ε	-	-
	7	+	+	+	+	ε	-	-
	8	+	+	+	+	ε	-	-
	9	+	+	+	ε	-	-	-
	10	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	-
	I2	+	+	+	+	+	-	-
L 3								
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-
	7	+	+	+	-	-	-	-
	8	+	+	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	ε	-	-	-
	10	+	+	+	+	ε	-	-
	II	+	+	+	+	ε	-	-
	I2	+	+	+	+	-	-	-
A 2								
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	5	ε	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-
	7	+	+	+	-	-	-	-
	8	+	+	+	ε	-	-	-
	9	+	+	+	ε	-	-	-
	10	+	+	+	+	-	-	-
	II	+	+	+	+	ε	-	-
	I2	+	+	+	+	-	-	-

meilleurs tests de la qualité d'une terre. Il est intéressant de noter aussi que ce pouvoir ammonifiant va de pair avec l'activité amylolytique et protéolytique de ces terres [2].

Ces différences de degré mises à part, l'allure du phénomène d'ammonification est la même pour les différents échantillons. La

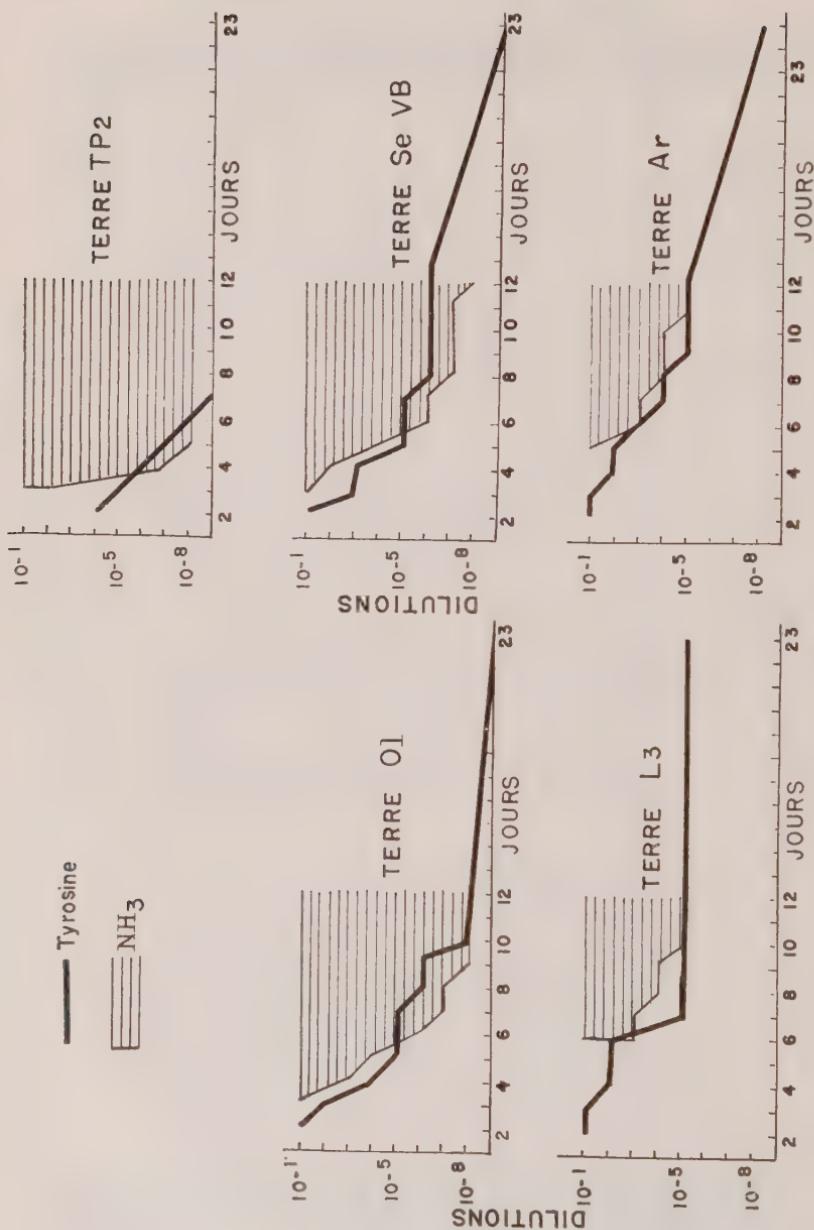


FIG. 1.

disparition de la tyrosine se fait dans le même sens, précoce dans les dilutions les plus faibles et plus tardive dans les dilutions fortes. La limite de disparition avance ainsi chaque jour de 10^{-1} à 10^{-8} progressivement, mais plus ou moins rapidement selon l'échantillon. La limite d'apparition de NH_3 , comme l'on s'y attendait, suit le même ordre, s'étendant de 10^{-1} à 10^{-8} , au fur et à mesure de la disparition de la tyrosine.

Une « *technique simplifiée* » pourrait être employée, qui consisterait en 2 lectures au 5^e et 10^e jour. En exprimant les résultats par le chiffre de la dilution positive limite, lors de ces 2 lectures, nous aurions, pour les terres étudiées :

	5 ^e JOUR	10 ^e JOUR
TP2	10^{-7}	—
O1	10^{-5}	10^{-8}
Se V.B..	10^{-5}	10^{-6}
A2	10^{-2}	10^{-5}
L3	10^{-2}	10^{-1}

VALEUR DE LA MÉTHODE : DISCUSSION.

ESSAI DE FIDÉLITÉ. — Afin de vérifier la constance des réactions, nous avons effectué sur TP2 une épreuve complémentaire, suivant la même technique, mais en testant chaque jour 6 tubes de chaque dilution. Pour la tyrosine, les 6 tubes donnent une réaction identique, sauf en ce qui concerne la zone de virage qui comporte généralement 1 ou 2 tubes aberrants, comme il fallait s'y attendre.

Pour l'ammoniac, les réactions sont beaucoup plus irrégulières, surtout en début d'expérience. On obtient fréquemment 3 tubes positifs et 3 négatifs dans la même dilution. Ceci nous confirme dans notre première idée que le test basé sur la disparition de la tyrosine est plus constant que celui basé sur le dégagement de NH_3 . Peut-être cela est-il dû à une réutilisation de NH_3 , par la microflore.

RELATIONS AVEC LES MÉTHODES ANTÉRIEURES.

La comparaison avec la méthode d'ammonification de Pochon et Tchan a déjà été tracée dans l'introduction de cette note. Nous y avons vu le parallélisme et l'accord des résultats obtenus suivant les deux techniques. Nous y ajouterons maintenant ce qui ressort d'une confrontation plus poussée.

Tout d'abord la tyrosine nous paraît mieux adaptée que le sang à servir, pour un dosage, de substrat ammonifiable, si l'on considère que le sang est de structure beaucoup plus complexe et comportant des facteurs de croissance (hématine, facteur X, V...).

Le groupement physiologique ammonifiant ainsi développé en présence de sang pourrait être moins spécifique que celui mis en évidence par la tyrosine. D'autre part, les risques de contamination sont beaucoup plus grands dans la méthode en terre et en sable, de par l'ouverture quotidienne des boîtes. Il arrive, avec cette technique, que les témoins sables non ensemencés se mettent à dégager tardivement de l'ammoniac en quantité assez importante pour être l'indice d'une contamination par l'air. Ce même phénomène, s'il se produit dans les boîtes de sables ensemencés, peut faire croire à un nouveau départ d'ammonification (éventualité de courbes à deux sommets). Enfin la multiplicité des facteurs intervenant dans la méthode en terre, facteurs souvent traduits par l'irrégularité des courbes, est ici considérablement réduite. Réduite aussi est la manipulation en employant la technique simplifiée proposée. En outre, la méthode à la tyrosine présente un double avantage : d'une part, sa plus grande sensibilité, d'autre part, la possibilité de calculer un rendement d'ammonification en sable.

1^o *Sensibilité.* — Les terres « Ar » et « L3 », avec la méthode à la poudre de sang, donnent des dégagements d'ammoniac négligeables en sable et en terre. Elles ne peuvent donc être différenciées, leur pouvoir ammonifiant apparaissant comme nul. Avec la méthode de dilution à la tyrosine leurs courbes d'ammonification, bien que voisines (voir ci-dessus) permettent de juger relativement plus active la microflore de « Ar ».

2^o *Rendement.* — Impossible à calculer en terre, d'où l'extraction de la tyrosine restante est impraticable, il peut l'être en sable. Tous les chiffres étant exprimés en milligrammes d'azote, nous avons trouvé :

N introduit	38 mg
N restant	22 mg
N utilisé	16 mg
N retrouvé dans NH ₃	10 mg
Rendement d'ammonification : 62 p. 100	

Malgré ces avantages, on peut reprocher à la méthode tyrosine d'être éloignée des conditions écologiques, reproche que l'on pourrait d'ailleurs adresser à toutes les méthodes par dilutions en milieu liquide (nitrification, dénitrification). Löhnius et Green avaient cependant déjà montré l'équivalence de valeur des mesures faites en milieu liquide et en terre ou sable [4]. Le pouvoir ammonifiant évalué par ce nouveau titrage est celui de la *microflore*. La seule méthode valable et qui ait fait ses preuves pour la mesure du pouvoir ammonifiant réel de la *terre* elle-même reste la méthode classique [3] en terre, mais elle est moins précise.

CONCLUSIONS.

L'attaque de la tyrosine par la microflore totale d'un sol, dans les conditions d'expérience indiquées, permet donc d'évaluer d'une manière rapide, surtout avec la technique simplifiée, le pouvoir ammonifiant de cette microflore.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. POCHON et Y. T. TCHAN. Ces *Annales*, 1947, **73**, 696.
- [2] M. A. CHALVIGNAC. Ces *Annales*, 1953, **84**, 816.
- [3] O. COPPIER et J. POCHON. Ces *Annales*, 1952, **83**, 200.
- [4] F. LOHNIS et H. H. GREEN. *Zentralbl. Bakt.* II, 1914, **40**, 457.

**DESCRIPTION
DE QUELQUES SOUCHES ENTOMOPHYTES
DE *BACILLUS CEREUS* FRANK. ET FRANK.,
AVEC REMARQUES SUR LEUR ACTION
ET CELLE D'AUTRES BACILLES SUR LE JAUNE D'ŒUF**

par C. TOUMANOFF (*).

(Institut Pasteur.)

Metalnikov et ses collaborateurs ont isolé des insectes malades, et principalement des chenilles des Lépidoptères, de nombreuses souches bactériennes dont les descriptions ont été présentées dans plusieurs publications [1, 2, 3, 4].

Ces descriptions parfois sommaires ont été effectuées lorsque la nomenclature bactériologique n'avait pas été établie sous une forme aussi précise qu'actuellement.

Steinhaus [5] dans son ouvrage sur la microbiologie des insectes a essayé de classer un certain nombre de souches décrites par Metalnikov et ses collaborateurs dans les genres actuellement admis. Il s'est trouvé que la plupart des germes pathogènes pour les insectes appartiennent surtout au genre *Bacillus* Kohn ; mais il n'a pas pu émettre de jugement sur leur nature réelle.

L'identification des germes entomophytes se pose au premier plan dans les recherches de la pathologie des insectes. Elle a une grande importance pour la lutte bactériologique contre les insectes nuisibles aux plantes dont Metalnikov fut un des pionniers.

La connaissance de la nature des germes pathogènes pour les insectes permettrait de présumer, puis de préciser la nature et les modalités de l'effet pathogène qu'ils exercent sur ces arthropodes et qui ne sont, actuellement, que peu connus.

Parmi les souches qui ont été laissées à l'Institut Pasteur par le regretté M. Metalnikov et qui nous ont été communiquées, certaines ont conservé leur virulence pour les chenilles des Lépidoptères et l'une de ces souches désignée sous le nom de P/3.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mars 1953.

isolée des chenilles de la pyrale du maïs (*Pyrausta nubilalis* Hübn), s'est avérée, encore en 1950, pathogène pour divers Lépidoptères *per os*, tout spécialement dans les conditions du laboratoire.

C'est ainsi que cette souche, dont nous avons à cette époque éprouvé la virulence au laboratoire pour *Malacosoma neustria*, la processionnaire du pin (*Thaumatopea pityocampa* L.) et la piéride du chou (*Pieris brassicæ*), tuait ces insectes *per os* respectivement dans 100, 75 et 100 p. 100 des cas, dans un temps variant de vingt-quatre à quatre-vingt-seize heures.

La souche P/3 était l'une de celles qui furent décrites par Metalnikov et Chorine, sous le nom de *Bacterium pyraustæ* [3], mais il est difficile de préciser laquelle.

Les trois autres souches de Metalnikov ont été désignées dans la collection comme étant *Bacterium cazaboun* n° 1, *Bacterium cazaboun* n° 2 et *Bacterium galechiæ* n° 1.

Leur description a été faite par Metalnikov, Ermolaeva et Skobelytzine, mais trop sommaire elle n'est pas suffisante [4].

Les souches désignées comme *Bacterium cazaboun* n°s 1 et 2 ont été isolées de la pyrale du maïs provenant des environs de Cazaboun, dans les Pyrénées, et *Bacterium galechiæ* de *Galechia gossypiella* d'Egypte [4, 1].

La virulence de ces souches dans les conditions du laboratoire pour les chenilles de *Malacosoma neustria* éprouvée par nous en 1950 était assez variable. Dans certaines expériences la mortalité atteignait jusqu'à 75 p. 100 des chenilles, dans d'autres elle ne portait que sur 25 à 30 p. 100 des insectes.

Le même effet a été enregistré sur *Thaumatopea pityocampa* L., mais l'efficacité de ces trois dernières souches sur *Pieris brassicæ* n'a pas pu être éprouvée.

Nous nous sommes donc attaché à apporter des précisions au sujet de la position systématique de ces diverses souches et nous présentons ci-dessous tout d'abord les caractéristiques de la souche P/3 de Metalnikov, pour la comparer ensuite avec d'autres bactéries.

a) *Etude de la souche P/3 :*

Morphologie. — Bâtonnets peu mobiles, Gram positif ; mesurant dans une culture de vingt-quatre heures de 1 à 4 ou 5 μ , formant des chaînettes de 15 à 60 μ . Spores centrales ou subterminales dont l'apparition est constatée déjà dans les cultures jeunes. Dans les cultures de quarante-huit heures ou plus âgées les formes végétatives mesurent de 2,5 à 5 μ , les chaînettes dépassant 60 μ de longueur. Dans les vieilles cultures (un mois et demi) certaines formes végétatives deviennent Gram négatif et on y observe des formes en voie de dégénérescence.

Culture. — Sur gélose ordinaire à pH 7-7,2 : les colonies sont arrondies, légèrement bombées et ternes à reflet cireux. L'enduit est d'un

blanc mat, légèrement jaunâtre, et la croissance très bonne en vingt-quatre heures sur milieu neutre.

Sur gélose ordinaire à pH 6 : la croissance est lente, imperceptible en vingt-quatre heures après l'ensemencement, mais abondante au bout de quatre jours, d'aspect gras et brillant.

Sur bouillon ordinaire : en vingt-quatre heures la culture est peu abondante, sous forme d'un trouble uniforme (surtout au milieu du tube), au début sans dépôt et avec un léger dépôt au bout de quatre jours.

La gélatine n'est liquéfiée que lentement et après quatre jours, la liquéfaction est incomplète, portant sur la moitié de la hauteur du milieu.

Sur la gélose au rouge neutre : croissance appréciable au bout de vingt-quatre heures avec virage du milieu en une couleur orange ; le septième jour, virage au jaune avec faible fluorescence. Pas de production de gaz, puis un mois après l'ensemencement, virage du milieu au jaune.

Pomme de terre : croissance très faible au bout de vingt-quatre heures ; enduit brillant jaunâtre ; le quatrième jour, même aspect, et le septième, enduit brunâtre assez fort qui ne change pas d'aspect après un mois de culture.

Sur le sérum coagulé : croissance faible au bout de vingt-quatre heures sans changement du milieu ; même aspect de culture, cependant plus dense au bout de quatre à sept jours. Le milieu devient légèrement rose un mois après sans être liquéfié.

Sur le milieu de Loeffler : croissance au bout de vingt-quatre heures sous forme d'un enduit brillant, légèrement verdâtre, devenant jaunâtre au bout de trois jours pour donner un virage au rose au bout d'un mois.

Le lait tournesolé est complètement décoloré au bout de vingt-quatre heures avec début de digestion. Le quatrième jour la digestion est presque complète au milieu du tube avec culot mauve ayant un anneau blanc, le liquide surnageant est d'une couleur mauve. Digestion et décoloration complètes au bout d'un mois.

Le petit lait tournesolé est décoloré au bout de vingt-quatre heures, il vire au bleu le quatrième jour, le septième il est violet et en un mois il redevient bleu.

Gélose au sang défibriné de lapin : légère hémolyse. Le germe est sans action sur les glucides suivants : *mannite*, *xylose*, *galactose*, *arabinose*. Il fait fermenter en vingt-quatre heures le *lévulose*, le *maltose*, le *glucose* et le *saccharose*.

Sur la gélose ordinaire additionnée de jaune d'œuf ce bacille pousse très bien. La croissance s'accompagne du blanchiment du milieu qui, du jaune transparent, devient blanc mat. Au bout de deux ou trois semaines de croissance à 30-32°, le milieu reste le même.

Le bacille réduit les nitrates en nitrites.

L'épreuve de la catalase est positive.

Il y a formation d'acétylméthylcarbinol (milieu de Clark).

Les caractères rapportés démontrent que cette souche appartient au groupe de *Bacillus cereus* Frank. et Frank., s'apparente

aux diverses formes des bacilles entomophytes de ce groupe et notamment aux *B. thuringiensis*, *B. cereus* var. *sotto* que nous avons décrit antérieurement, ainsi qu'à *B. cereus* var. *alesti* que nous avons étudié et décrit avec C. Vago [6 et 7].

Désignation de la souche	Durcissement du jaune après ensemencement direct dans l'oeuf	Précipitation (blanchissement) de la gélose ordinaire au jaune d'oeuf	Précipitation (milieu de Mc. Clung, Heindrich et Toabe)	Effet sur la suspension du jaune d'oeuf (de Mc. Clung et Toabe)
<i>Bacillus cereus</i> P/3	+++	+++	+++	+++
<i>B. cereus</i> <u>cazaboun</u> 1	+++	+++	+++	+++
<i>B. cereus</i> <u>cazaboun</u> 2	++	+++	+++	++
<i>B. cereus</i> var. <i>sotto</i>	+++	+++	+++	+
<i>B. cereus</i> var. <u>alesti</u>	+++	+++	+++	+++ pigment
<i>B. cereus</i> var. <u>gale-chiae</u>	++	+++	+++	+++
<i>B. alvei</i>	-	-	-	-
<i>B. megatherium</i>	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> (souche <u>virulente</u>)	-	+	?	-
<i>B. anthracis</i> (s. <u>atténuee</u>)	±	+	?	-
<i>B. larvae</i>	-	-	-	-
<i>B. laterosporus</i>	±	-	-	-

Lorsqu'on compare cependant cette souche à celles antérieurement décrites, on constate que, tout en présentant certains caractères communs avec d'autres bacilles entomophytes du groupe *cereus*, elle peut être différenciée de certains d'entre eux.

Voici la comparaison de *Bacillus cereus* P/3 avec d'autres souches entomophytes que nous possédons.

Ce bacille forme dans les cultures sur gélose ordinaire de longues chaînettes qui coexistent avec les bâtonnets isolés, ce qui le rapproche de *Bacillus cereus* var. *sotto* et des deux formes de *thuringiensis* antérieurement comparées [8].

Il liquéfie lentement la gélatine comme *Bacillus thuringiensis*

d'origine française et aussi *Bacillus cereus* var. *alesti*, et non pas rapidement comme *B. sotto* (Ishiwata).

Il modifie, comme *B. cereus* var. *sotto*, la gélose glucosée au rouge neutre, sans production de gaz, ce milieu demeurant inchangé sous l'effet de *B. cereus* var. *alesti* [7] et *B. cereus* var. *thuringiensis* d'origine française et n'est que faiblement modifié par *thuringiensis* d'origine allemande [8].

L'action de la souche P/3 sur le petit lait tournesolé est comparable à celle de *B. sotto* et des deux souches de *thuringiensis*. On y observe le phénomène de caméléonage qui ne s'observe pas pour *B. cereus* var. *alesti*, comme nous l'avons signalé avec C. Vago [7].

La croissance sur le milieu jaune d'œuf des deux souches de *B. thuringiensis* fut la même que celle de *B. cereus* P/3. Le *B. cereus* var. *sotto*, qui au début forme sur ce milieu une couche d'un blanc crémeux, devient au bout de deux ou trois semaines d'un brun clair pour rester tel dans les vieilles cultures.

Ce *cereus* P/3 se distingue aussi de *B. cereus* var. *alesti*, cette dernière souche formant, quoique inconstamment, sur le milieu au jaune d'œuf une couche de pigment d'abord d'un rose clair qui devient en deux ou trois semaines d'un rouge brique.

Colmer [9] a constaté que *B. cereus* et les espèces voisines exercent une action spéciale sur le complexe lécithinique du jaune d'œuf, qui consisterait en la modification de la fraction phospholipidique du jaune sous l'effet d'une lécithinase sécrétée par *B. cereus* qui modifierait l'état colloïdal de la lécithine.

La précipitation du jaune d'œuf permettrait, d'après cet auteur, de différencier les bacilles du genre *cereus* d'autres représentants du genre *Bacillus*.

L'action sur le jaune d'œuf est même l'apanage exclusif des *cereus* et *mycoides*, quoiqu'elle se manifeste particulièrement et inconstamment avec d'autres bacilles et notamment *B. anthracis*, ce qui dénote néanmoins ses affinités avec *B. cereus*.

La modification de l'aspect de la gélose ordinaire au jaune d'œuf, qui vire rapidement au blanc mat ou blanc jaunâtre couleur ivoire, serait à rapprocher des constatations de Colmer.

Nous avons du reste observé une modification semblable en ensemençant nos souches sur le milieu spécial au jaune d'œuf de McClung, Heidenreich et Toabe [12] qui fut utilisé par Colmer.

Nous avons procédé aussi à l'ensemencement de la souche *cereus* P/3 ainsi que de toutes les autres souches de *B. cereus* entomophytes, selon le mode préconisé par Colmer, directement dans l'œuf et nous avons observé le durcissement et rétrécissement du jaune qui se décolorait et baignait à l'intérieur de la coque dans l'albumine liquéfiée différemment colorée. Dans le cas de *cereus* P/3 et des deux *thuringiensis* le liquide était rose rougeâtre,

ainsi que dans celui de *B. sotto* ; il fut rougeâtre violacé dans le cas de *B. cereus* var. *alesti*, dont la croissance dans l'œuf s'accompagnait de la formation d'une couche de pigment rouge sur la surface durcie du jaune.

Enfin dans la suspension du jaune d'œuf préparé selon le procédé de McClung et Toabe [10], quelques différences ont été observées à la suite de la croissance des diverses souches étudiées.

Bacillus sotto changeait la couleur de la suspension en provoquant en vingt-quatre heures son blanchiment et sa solidification, cette suspension redevenant quatre jours plus tard de nouveau liquide, mais restant d'une consistance épaisse.

Bacillus cereus var. *alesti* blanchissait cette suspension et la solidifiait sur le tiers supérieur du tube, celle-ci demeurant liquide et jaunâtre dans ses deux tiers inférieurs.

La croissance de ce bacille dans cette suspension s'accompagnait d'autre part de la formation d'un pigment rose violacé à la surface.

Quant au *Bacillus cereus* P/3 il blanchissait le milieu et le solidifiait en vingt-quatre à quarante-huit heures sans formation de pigment.

b) *Comparaison de « B. cereus » P/3 avec « B. cazaboun » n° 1, « B. cazaboun » n° 2 et « B. galechiæ » :*

Le *Bacterium galechiæ* de Metalnikov et Metalnikov [1] ainsi que les souches désignées par cet auteur et ses collaborateurs sous les noms de *Bacterium cazaboun* n° 1 et *Bacterium cazaboun* n° 2 ne se distinguent que par quelques caractères que voici :

Les *Bacterium cazaboun* n°s 1 et 2 de Metalnikov ne provoquent pas la fluorescence du rouge neutre qu'on observe dans le cas de P/3.

Le *B. cazaboun* n° 1 et *B. galechiæ* poussent sur le sérum coagulé sous forme d'un enduit légèrement rose sans digestion du milieu.

Les *cazaboun* 1 et 2 liquéfient d'autre part légèrement ce milieu.

Dans le bouillon ordinaire, seul *cazaboun* n° 2 pousse très rapidement, les trois autres souches n'y poussent que lentement.

Le P/3 montre une croissance lente dans le bouillon à pH 6, les trois autres souches présentant dans ce milieu une croissance rapide.

La croissance de P/3 et des deux *B. cazaboun* sur la pomme de terre est lente, celle de *B. galechiæ* étant rapide.

Le P/3 fait virer le lait tournesolé au rose, rapidement, les trois autres souches ne produisant qu'un virage tardif.

Le P/3 fait virer le petit lait tournesolé au rose lentement, les

trois autres souches donnant à ce milieu tardivement une teinte mauve.

Nous avons constaté que contrairement à ce qui a été noté par Metalnikov et ses collaborateurs, le *B. cazaboun* n° 1 ne faisait fermenter ni la mannite, ni le galactose.

La suspension du jaune d'œuf de McClung et Toabe [10] blanchissait et se solidifiait en vingt-quatre heures à la température de 32° sur environ plus d'un tiers du tube à essai sous l'effet de *B. cazaboun* 1, et entièrement sous l'effet de *B. cazaboun* 2 et *B. galechiæ*.

Du point de vue de l'action sur la suspension du jaune d'œuf les *B. cazaboun* n° 1 et *B. galechiæ* ressemblaient donc plutôt à *Bacillus* P/3 qu'à *B. cereus* var. *sotto* ou *B. cereus* var. *alesti*.

Ensemencé dans l'œuf *Bacillus cazaboun* n° 1 provoquait un fort durcissement du jaune qui baignait dans l'albumine bien liquéfiée, mais incolore. Le durcissement était moins prononcé avec *B. cazaboun* n° 2 et aussi avec *B. galechiæ*, l'albumine demeurant incolore.

Pour comparer l'effet de nos souches sur le complexe lécithique du jaune d'œuf avec celui d'autres bacilles, nous avons étudié le comportement sur divers milieux au jaune d'œuf et aussi dans l'œuf entier de : *B. alvei* Ch. et Ch., *Bacillus megatherium*, les souches virulentes et atténuées de *B. anthracis*, *B. larvæ* et *B. laterosporus*.

Il en résulte que ni l'un ni l'autre des deux premiers bacilles ne modifient la gélose au jaune d'œuf qui restait jaune et transparente, ni le jaune de l'œuf qui ne présentait pas de durcissement, ni enfin la suspension du jaune préparée par le procédé de McClung et Toabe [10].

Le *Bacillus mycoides* (souche de l'Institut Pasteur) produisait le durcissement du jaune dans l'œuf ensemencé directement, et le blanchiment de la gélose ordinaire à l'œuf ainsi que du milieu au jaune d'œuf de McClung, Heidenreich et Toabe, préconisé tout d'abord pour l'étude des formes du genre *Clostridium* et leurs toxines [12].

L'ensemencement d'une culture virulente du *Bacillus anthracis* sur gélose additionnée de jaune d'œuf n'a pas permis de révéler un blanchiment notable du milieu au bout d'une semaine de croissance.

La culture du même bacille rendue moins virulente (premier vaccin) provoquait le blanchiment allant sur la moitié de la profondeur de la gélose inclinée, moins apparent toutefois que pour les souches de *B. cereus*.

Les œufs ensemencés dans le jaune avec le charbon virulent n'étaient pas modifiés même au bout de trois semaines. Par contre, ceux inoculés d'une culture atténuée de *B. anthracis*

avaient le jaune présentant l'aspect du miel au début de cristallisation, aspect résineux d'un blanc jaunâtre, accusant un certain degré de solidification, mais pas de durcissement.

Il apparaît ainsi que le jaune durcit partiellement sous l'effet d'une culture atténuée, et pas du tout avec la culture virulente (1).

Ces constatations confirment *grossost modo* celles de Colmer obtenues avec ces bactéries [9].

L'agent pathogène de la loque américaine des abeilles, *Bacillus larvæ* qui, comme on le sait, ne pousse que sur la gélose additionnée d'œuf ou bien sur les milieux ordinaires ou synthétiques additionnés de thiamine, ne modifie pas le jaune, ni dans le milieu au jaune d'œuf, ni lorsqu'il est ensemencé dans l'œuf directement.

En résumé les quatre principaux germes, reconnus pathogènes pour les chenilles de certains insectes Lépidoptères et décrits par Metalnikov et ses collaborateurs sous les noms de *Bacterium pyraustæ* (souche P/3), *B. cazaboun* n° 1, *B. cazaboun* n° 2 et *B. galechiæ*, appartiennent au genre *Bacillus* et font partie du groupe *cereus*.

Cette assimilation avec la constatation récente de Stephens [16], au Canada, de l'effet pathogène de *cereus* sur *Carpocapsa pomonella* L. et celle que nous avons faite avec C. Vago pour les vers à soie [6, 7] démontrent l'importance que jouent les bactéries de ce groupe dans la pathologie des insectes.

Il a été reconnu que toutes les souches entomophytes du groupe *cereus*, cultivées sur les milieux variés au jaune d'œuf ou bien directement dans l'œuf, exercent sur le complexe lécithinique du jaune le même effet que les bactéries du même groupe d'origine différente étudiés par Colmer [9].

D'autres bactéries entomophytes, et notamment *B. alvei* et *B. larvæ* du couvain des abeilles, ainsi que *B. megatherium* et *B. laterosporus*, n'ont pas manifesté le même effet sur le jaune d'œuf dans divers milieux et dans les suspensions utilisées.

B. mycoides et *B. anthracis* (souches virulente et peu virulente) étaient à ce point de vue moins actifs que les souches de *cereus*.

(1) Les souches de *B. anthracis* (souche virulente et premier vaccin) nous ont été aimablement communiquées par M. Jacotot, et celle de *B. megatherium* par M. Lemoigne, chefs de service à l'Institut Pasteur, à qui nous tenons à exprimer nos remerciements.

Nos constatations confirment donc, dans l'ensemble, l'assertion de Colmer, que l'action sur le complexe lécithinique de l'œuf constitue l'apanage des bactéries sporogènes du groupe *cereus* ou des espèces proches (*B. anthracis*, *B. mycoides*).

Il ressort de l'étude du comportement des *cereus* entomophytes sur le milieu au jaune d'œuf et dans l'œuf, que ces souches produisent de la lécithinase.

Il est probable, mais cela reste à prouver, qu'il s'agit dans ce cas d'une lécithinase D, comme l'avaient établi Chu [15], puis Bond et Colmer [17], pour quelques *cereus*.

On sait d'après les travaux de MacFarlane et Knight (1941) que l' α -toxine de *Clostridium welchii* est une lécithinase D ; elle ressemble d'autre part, d'après Chu [15], quant à ses propriétés, à la lécithinase formée par *B. cereus*.

Il n'est pas exclu que la production de lécithinase joue un rôle dans l'effet toxique des bactilles du groupe *cereus* sur les insectes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. METALNIKOV et Serge METALNIKOV fils. *Acad. Agric. France*, 1932, Séance du 10 février.
- [2] S. METALNIKOV et V. CHORINE. *Ces Annales*, 1928, **42**, 1635.
- [3] S. METALNIKOV et V. CHORINE. *Ces Annales*, 1929, **43**, 136.
- [4] S. METALNIKOV, J. ERMOLAEVA et SKOBELZYNE. *Ces Annales*, 1931, **46**, 467.
- [5] E. STEINHAUS. *Insect Microbiology*, N.-Y., 1947.
- [6] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1504.
- [7] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *Ces Annales*, 1952, **83**, 634.
- [8] C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1952, **82**, 512.
- [9] A. R. COLMER. *J. Bact.*, 1948, **55**, 777.
- [10] L. S. McCLEUNG et R. TOABE. *J. Bact.*, 1947, **53**, 139.
- [11] E. J. KING. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 799 (cité d'après Colmer).
- [12] L. S. McCLEUNG, P. HEIDENREICH et TOABE. *J. Bact.*, 1946, **51**, 752.
- [13] W. E. VAN HEYNINGEN. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1246.
- [14] M. G. MACFARLANE et B. C. J. G. KNIGHT. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 884.
- [15] H. P. CHU. *J. Gen. Microb.*, 1949, **3**, 255
- [16] J. STEPHENS. *Canad. J. Zoology*, 1952, **30**.
- [17] J. BOND et A. COLMER. *Proc. La. Acad. Sci.*, 1950, **43**, 19. (Cité à titre bibliographique, non consulté dans l'original.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE DU BACILLE DE WHITMORE

(PREMIER MÉMOIRE)

par P. DE LAJUDIE et E. R. BRYGOO (*).

(Institut Pasteur de Saigon.)

Nous avons isolé, au cours des trois dernières années, 26 souches de *Malleomyces pseudomallei* chez 15 malades, ce qui porte à 43 le nombre de souches isolées à Saigon depuis 1948 chez 25 malades. Cette étude nous a conduits à faire un assez grand nombre d'inoculations aux animaux ; il nous a paru intéressant de faire une revue de la question, de rapporter les premiers résultats de nos observations, et de rechercher si le pouvoir pathogène variait selon l'origine des souches, le temps écoulé depuis leur isolement, et le nombre de germes inoculés.

POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL.

1^o CHEZ L'HOMME. — Les 15 malades chez lesquels nous avons isolé le bacille de Whitmore comprenaient 7 Européens, 2 Asiatiques et 6 Africains. Les observations cliniques montrent le polymorphisme bien connu des manifestations de la mélioïdose, avec une plus grande fréquence cependant des atteintes pulmonaires. L'évolution et la gravité se montrèrent très variables, depuis la septicémie rapidement mortelle et les formes pulmonaires avec fonte purulente des poumons, jusqu'au simple abcès localisé, sans phénomènes généraux, spontanément curable, qui entre dans le cadre des formes « latentes » de mélioïdose sur lesquelles ont insisté R. Green et D. S. Mankikar [1] (1). La forme suraiguë cholériforme, classiquement décrite, n'a pas été observée. Dans les antécédents des malades, nous avons relevé fréquemment, comme l'ont fait avant nous M. Alain, J. Saint-Etienne et V. Reynes [2], des causes diverses de défaillance organique :

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1953.

(1) Deux observations de M. Alain, J. Saint-Etienne et V. Reynes [2] montrent que de telles formes, après une période de latence parfois supérieure à un an, peuvent aboutir à une septicémie mortelle.

longs séjours sous les tropiques, opérations militaires, traumatismes, éthylosme, tuberculose ; dans une de nos observations, la mélioïdose est apparue comme complication d'un kala-azar [3]. Dans un cas cependant [4], il s'agissait d'une atteinte pulmonaire grave d'apparence primitive, chez un jeune homme sans antécédents pathologiques importants.

2^o CHEZ L'ANIMAL. — Depuis l'épidémie observée par Fletcher en 1913 et les quelques cas de mélioïdose sporadique signalés ensuite par Stanton et Fletcher [5, 6] chez des animaux de laboratoire (cobayes, lapins, rats), on admet que la mélioïdose est une maladie naturelle des rongeurs. Les auteurs anglais en ont bien décrit la symptomatologie, très différente de celle de la maladie expérimentale, et débutant par un écoulement oculaire et nasal d'aspect laiteux ; dans les cas rapidement évolutifs, les lésions sont limitées aux voies aériennes supérieures ; si l'évolution est plus lente, on observe des nodules dans les poumons et même dans l'endocarde, une hypertrophie de la rate, des tubercules péritonéaux, des adénites multiples.

Cependant, Stanton et Fletcher ont reconnu, après avoir examiné de très nombreux muridés à Kuala-Lumpur, que cette affection n'est pas commune chez le rat ; P. Delbove et V. Reynes [7] firent la même constatation à Saïgon (ils n'ont isolé qu'une souche de bactérie de Whitmore sur 20 000 rats examinés) et M. Vaucel [8] examina à ce point de vue, sans succès, 560 rats à Hanoï.

On a, d'autre part, signalé de très rares cas de mélioïdose chez d'autres espèces animales : chien, chat, vache, cheval ; chez ces animaux, le diagnostic de mélioïdose est une surprise d'autopsie : des abcès pulmonaires sont signalés [9]. Girard [10] admet que le porc peut être un porteur sain de bactérie de Whitmore à Tananarive.

Pas plus que nos prédecesseurs, nous n'avons observé à Saïgon de cas de mélioïdose naturelle, ni chez nos animaux de laboratoire (lapins, cobayes, souris, singes, bufflons), ni chez les rats qui nous sont apportés pour la recherche du bacille de Yersin, ni chez les porcs dont nous examinons les ganglions mésentériques pour la recherche des *Salmonella*.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

Stanton et Fletcher [6], Topley et Wilson [11], J. Dumas [12] insistent sur la grande sensibilité du cobaye et du lapin ; pour W. R. Miller [13], le hamster serait l'animal de choix. Le rat est considéré comme relativement résistant ; *Macacus cynomolgus*, chèvres, mouton et bétail sont moins sensibles ; le cheval, le porc

et les volailles sont résistants ; selon R. Pons [14], chez le porc-épic, « le germe peut persister vivant aux lieux d'inoculation pendant plusieurs mois ». Cependant, les renseignements diffèrent parfois selon les auteurs ; peu nombreux sont ceux qui ont pu étudier le pouvoir pathogène du bacille de Whitmore sur un nombre d'animaux relativement important.

Voici à ce point de vue, les résultats de notre expérimentation.

A. — ANIMAUX A SANG FROID.

a) *Grenouilles*. — Six grenouilles inoculées par voie sous-cutanée, les unes avec 1 000 000 de germes, les autres avec 100 000 germes, ont toutes survécu plus de vingt jours. Elles sont mortes du vingtième au quarantième jour ; la rétroculture (sang du cœur) a constamment été négative.

b) *Poissons*. — Douze cyprins furent inoculés par voie sous-cutanée avec des doses variant de 10 000 à 1 000 000 de germes. Trois d'entre eux survécurent plus de trois mois ; l'un avait reçu la dose maximum. Neuf moururent du deuxième au dix-huitième jour. Pour un seul, inoculé avec 1 000 000 de germes, et mort en quarante-huit heures, la rétroculture (liquide péritonéal) donna un bacille de Whitmore.

A l'autopsie des grenouilles et des poissons, nous n'avons pas constaté de lésion macroscopiquement évidente pour un observateur peu au courant de l'anatomie de ces animaux.

B. — ANIMAUX A SANG CHAUD.

1^o *OISEAUX*. — a) *Poulets*. — Deux poulets de 1,500 kg inoculés l'un avec 10, l'autre avec 100 000 000 de germes par voie sous-cutanée, survécurent quatre mois. Ils furent alors sacrifiés ; ils ne présentaient aucune lésion visible ; le sérum de l'un agglutinait le bacille de Whitmore à 1/50, celui de l'autre à 1/200.

b) *Pigeons*. — Sur 5 animaux inoculés par voie intramusculaire avec des doses variant de 10 à 50 000 000 de germes, 3 survécurent de trois à quatre mois et furent sacrifiés ; leurs sérum agglutinaient le bacille de Whitmore à des taux de 1/50, 1/200 et 1/400. Le quatrième mourut au bout de trois jours, mais la rétroculture (sang du cœur) ne permit d'isoler qu'une *Pasteurella* (il s'agissait d'un animal qui avait déjà servi à l'étude de la virulence d'une *P. avicida*). Le cinquième enfin mourut le vingtième jour, après être resté quelques jours couché ; son autopsie ne révéla aucune lésion caractéristique, mais la rétroculture (sang du cœur) fut positive pour le bacille de Whitmore.

2^o MAMMIFÈRES. — a) *Souris*. — La durée de la survie s'est montrée, dans l'ensemble, d'autant plus courte que la dose injectée était plus forte : trois jours pour 5 souris qui avaient reçu 5 000 000 de germes par voie sous-cutanée ; trois à cinq jours pour 3 autres qui avaient reçu 2 à 3 000 000 de germes : treize et vingt jours respectivement pour 2 autres inoculées avec 1 000 000 de germes ; enfin, sur 2 autres qui n'avaient reçu que 100 000 germes, l'une mourut en neuf heures, l'autre survécut (sacrifiée quatre mois plus tard, elle ne présentait aucune lésion, et la culture du sang du cœur resta négative). Les 11 autres animaux présentèrent à l'autopsie une hypertrophie ganglionnaire généralisée, une forte splénomégalie et un épanchement péritonéal discret ; les rétrocultures (sang du cœur) furent positives pour le bacille de Whitmore.

Nous avons fait deux essais infructueux d'infection par badigeonnage de la muqueuse buccale.

Stanton et Fletcher ont signalé la résistance relative du rat à la mélioïdose ; la souris semble se comporter de même ; la durée de l'évolution est plus longue que chez le cobaye, et certains animaux peuvent survivre à l'inoculation virulente. Nous en avons eu un autre exemple, déjà rapporté par ailleurs [3] : un jeune chien et deux souris ayant été inoculés, par voie intraperitoneale, avec le sang d'un malade atteint de mélioïdose et de kala-azar, le premier mourut de mélioïdose, tandis que les deux souris survécurent.

b) *Chien*. — Le chien dont il vient d'être question mourut en huit jours ; il présentait seulement un léger exsudat péritonéal, sans aucune lésion viscérale ; les rétrocultures furent positives à partir du sang du cœur et du liquide péritonéal.

c) *Lapins*. — Ils sont sensibles à l'infection expérimentale ; 5 de ces animaux, inoculés par voie sous-cutanée avec 10 millions de germes, sont morts en sept à treize jours ; ils présentaient tous un abcès au point d'inoculation, avec adénopathie satellite, un épanchement péritonéal discret, une vessie très distendue et des lésions congestives des poumons ; la culture du sang du cœur permit de mettre régulièrement en évidence le bacille de Whitmore. La preuve de la sensibilité du lapin à la mélioïdose a maintes fois été apportée lors de la préparation de sérum agglutinants, quand nous injections aux animaux des suspensions de bacille de Whitmore imparfaitement stérilisées par chauffage. Cependant, nous n'avons pas réussi à infecter deux lapins par badigeonnage des muqueuses buccale et nasale avec des cultures vivantes de ce germe.

d) *Cobayes*. — Le cobaye est, de tous les animaux sur lesquels nous avons expérimenté, le plus sensible. Tous les modes d'inoculation peuvent être utilisés. G. Blanc et M. Baltazard [45] ont

réalisé la maladie expérimentale par piqûre de *X. cheopis* et d'*Aedes aegypti* infectés. Les symptômes de la maladie naturelle pourraient être reproduits par ingestion, application sur la muqueuse nasale ou insufflation nasale ; nous avons échoué dans les essais que nous avons faits chez deux cobayes, en badigeonnant énergiquement les muqueuses buccale et nasale avec des cultures de bacille de Whitmore.

Selon les ouvrages classiques, le dépôt de matériel virulent sur la peau rasée et scarifiée provoque une infection générale ; c'est un cobaye préalablement rasé que M. Vauzel put infecter par immersion dans l'eau d'une mare [8].

Cependant, cette méthode ne semble pas présenter, à notre avis, d'avantages manifestes sur l'inoculation par voie sous-cutanée, et elle peut se montrer infidèle. Ainsi, en une circonstance, recherchant le bacille de Whitmore dans une expectoration, nous inoculâmes 2 cobayes, l'un sur la peau rasée et scarifiée, l'autre par voie sous-cutanée : le premier ne présenta aucun symptôme pathologique, tandis que le second mourut en sept jours de mélioïdose.

Maladie expérimentale du cobaye. — Vingt et un cobayes, inoculés avec des produits pathologiques ou avec des souches récemment isolées, sont morts en un temps variant de deux à quatorze jours.

Sept avaient reçu des produits pathologiques divers (2 pus, 2 urines, 2 expectorations) ; ils sont morts en quatre (3 animaux) à sept jours (1 animal). Les 14 autres furent inoculés par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de cultures de vingt-quatre heures en bouillon de souches fraîchement isolées (50 000 000 de germes environ). Ils moururent dans les délais suivants :

Jours	1	3	5	7	8	14
Nombre de cobayes	1	5	3	3	1	1

Les deux tiers des animaux étaient donc morts le cinquième jour ; ceux dont la survie se prolongea présentaient tous, dès le quatrième ou cinquième jour, un volumineux abcès local et, lorsqu'il s'agissait de mâles, une orchite importante.

Chez tous les animaux, la rétroculture fut positive ; à l'autopsie, ils présentaient un abcès au point d'inoculation, fréquemment une adénopathie satellite, une splénomégalie avec microabcès de la rate, de l'hépatisation pulmonaire, une hypertrophie constante des capsules surrénales, un épanchement péritonéal et, chez les mâles, une orchite, comme nous venons de le signaler.

Si les symptômes observés sont donc assez constants, la durée de la survie peut varier dans d'assez larges limites : ceci semble tenir plus à la résistance individuelle des animaux qu'à des différences de virulence des souches. En effet, il est fréquent de

constater des variations du même ordre lorsque la même souche est inoculée dans des conditions comparables à plusieurs animaux.

L'ancienneté de la souche ne semble guère intervenir dans l'évolution de la maladie expérimentale. Par comparaison avec les résultats ci-dessus, qui concernent des souches fraîchement isolées, nous avons inoculé 8 cobayes, par voie sous-cutanée, avec 0,5 cm³ d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures d'une souche conservée dans notre collection depuis quatre ans : les animaux moururent tous en trois à six jours, donc dans les mêmes délais, et avec les mêmes lésions que ceux qui avaient été inoculés avec des souches récemment isolées.

Il est intéressant de noter que la souche dont il vient d'être question est une souche fixée, qui ne donne que des colonies lisses (souche C 141 de notre collection); sa virulence n'est donc

(1) Rate augmentée de trois fois son volume.

pas inférieure à celle des autres souches que nous avons expérimentées dans des conditions comparables (injection sous-cutanée de 50 millions de germes environ). Elle s'est montrée également virulente pour 8 souris et 5 lapins.

Le tableau ci-joint résume les constatations que nous avons faites à l'autopsie de 27 cobayes qui avaient été inoculés par voie sous-cutanée avec un nombre de germes déterminé. Si les lésions observées sont assez comparables, quelle que soit l'importance de l'inoculum, la durée moyenne de l'évolution n'est que légèrement prolongée chez les animaux qui ont reçu le plus petit nombre de germes.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons isolé, en trois ans, le bacille de Whitmore chez 15 malades atteints de formes cliniques de mélioïdose très variables dans leur symptomatologie et leur gravité.

Nous n'avons pas observé de cas de mélioïdose animale naturelle. Nous avons constaté que les animaux à sang froid et les oiseaux sont résistants à l'infection expérimentale, que la souris est relativement peu réceptive, mais que le jeune chien, le lapin et surtout le cobaye sont très sensibles.

Le dépôt de matériel virulent sur la peau rasée du cobaye ne produit pas toujours l'infection.

Nous n'avons pas réussi à reproduire les symptômes de la maladie naturelle chez les souris, les lapins et les cobayes, par badigeonnage de la muqueuse buccale avec des cultures de bacille de Whitmore.

Inoculé par voie sous-cutanée, le cobaye fait une maladie mortelle en deux à quatorze jours ; la durée de l'évolution et les lésions anatomo-pathologiques semblent, dans une assez large mesure, indépendantes de l'origine de la souche de bacille de Whitmore, de son ancienneté, de son aspect lisse ou plissé ; les variations que l'on peut observer tiennent plutôt à la différence de sensibilité individuelle des animaux. Les caractères anatomo-pathologiques les plus constants sont : l'abcès local avec adénite satellite, la splénomégalie, l'hépatisation pulmonaire et l'hypertrophie des capsules surrénales.

Nous nous proposons de poursuivre et de compléter ces recherches, et de les étendre à d'autres espèces animales.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. GREEN et D. S. MANKIKAR. *Brit. Med. J.*, 1949, 308.
- [2] M. ALAIN, J. SAINT-ETIENNE et V. REYNES. *Méd. Trop.*, 1949, 9, 119.
- [3] P. DE LAJUDIE, L. FORTE et E. R. BRYGOO. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1945, 45, 45.

- [4] E. R. BRYGOO et P. DE JAUREGUIBERRY. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1945, **45**, 62.
- [5] A. T. STANTON et W. FLETCHER. *Trans. 4th Congr. Far East Ass. trop. Med.*, 1921, **2**, 196.
- [5] A. T. STANTON et W. FLETCHER. *Trans. 4th Congr. Far East Ass.* 1932, n° 21.
- [7] P. DELBOVE et V. REYNES. *Rev. Med. Fr. Extr.-Orient*, 1942, **20**, 172.
- [8] M. VAUCEL. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1937, **30**, 10.
- [9] Kuala-Lumpur Institute for Medical Research. *Annual Report for the year 1949*.
- [10] G. GIRARD. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1936, **29**, 712.
- [11] TOPLEY et WILSON's. *Principles of Bacteriology and Immunity*. London, 1948.
- [12] J. DUMAS. *Bactériologie médicale*, Paris, 1951.
- [13] W. R. MILLER et coll. *J. Bact.*, 1948, **55**, 115.
- [14] R. PONS. *Ces Annales*, 1927, **41**, 1338.
- [15] G. BLANC et M. BALTAZARD. *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 1947, **3**, 520.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 7 Mai 1953.

Présidence de M. LEMOIGNE.

CULTURES CELLULAIRES ET VIRUS POLIOMYÉLITIQUE

par C. LEVADITI.

(*Institut Alfred Fournier.*)

J. F. Enders [1], dans une préface, et ses collaborateurs, T. H. Weller, F. C. Robbins, M. B. Stoddard [2, 3], dans des travaux parfaitement documentés, font savoir, preuves à l'appui, qu'il est possible de cultiver *in vitro* le virus poliomyélitique (souches Lansing, Brunhilde et Léon) en présence d'éléments cellulaires d'organes embryonnaires d'homme ou d'animaux, éléments eux-mêmes à l'état de survie et de multiplication. Le virus pullule au contact des histiocytes ; sa présence et son enrichissement sont mis en relief par le nombre élevé des passages réalisés par deux techniques : cultures en milieux liquides et semi-solides (plasma). Les transferts, à titre de contrôle de l'activité pathogène, ont été effectués soit sur le singe (souches Brunhilde et Léon), soit sur la souris (souche Lansing).

Ayant mis en évidence, en 1913 [4], la même possibilité de cultiver le virus de la poliomyélite *in vitro*, et cela dans des conditions presque identiques à celles rapportées par les savants américains, je me permets de rappeler mes propres investigations. Voici, en substance, la technique et les résultats ayant fait l'objet de mes publications :

Technique. — Virus poliomyélitique présent dans le névraxie de singes morts paralysés par suite d'inoculations transcraniennes. Milieu : plasma de simiens. Culture cellulaire de *ganglions rachidiens* de macaques, en boîtes de Gabritchewski (à 37° C). La multiplication des cellules ganglionnaires hors de l'organisme avait été démontrée auparavant par Marinesco et Minea [5], la richesse des ganglions en virus par moi-même, en collaboration avec Landsteiner et Danulesco. Epreuve de la virulence par transferts intranévraxiques à des simiens.

Résultats. — Trois essais :

a) *Pullulation des éléments cellulaires cultivés.* L'examen histologique

a montré qu'il ne s'agissait nullement de neurones ganglionnaires (la zone centrale des fragments de ganglions se nécrosant pendant le séjour de ceux-ci dans le milieu plasmatique), mais de cellules conjonctives d'origine capsulaire et, tout au début, de leucocytes polynucléaires inclus dans les ganglions inflammés, leucocytes mobilisés ultérieurement.

b) *Nombre de passages* : 4 lors du premier essai, 8 lors du second et 6 du troisième.

c) *Durée du séjour à 37° C.* : 5, 11, 14 et 21 jours lors du premier essai, 43 lors du second et 24 lors du troisième.

d) *Virulence positive* : 1^{re} expérience, le vingt et unième jour ; 2^e expérience, le treizième jour ; 3^e expérience, également le treizième jour.

J'ai conclu que : « *s'il y a symbiose entre les cellules cultivées et le virus, cette symbiose n'intéresse pas forcément les cellules nerveuses : ces dernières peuvent, en effet, avoir perdu depuis longtemps leur vitalité, sans qu'il y ait eu pour cela arrêt de la vie et de la multiplication du germe. Les éléments du tissu conjonctif (histiocytes) et les cellules capsulaires assurent, à eux seuls, les conditions qui favorisent in vitro la conservation et la pullulation du virus de la poliomyélite.* »

Certes, mes essais étaient loin d'offrir la précision des résultats relatés par J. F. Enders et ses collaborateurs, résultats qui laissent entrevoir une importance pratique de la culture du virus poliomyélétique. Si je me permets d'en dire quelques mots, c'est, tout simplement, à titre documentaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. F. ENDERS. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 629.
- [2] T. H. WELLER, J. E. ENDERS, F. C. ROBBINS et M. B. STOBBDARD. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 645.
- [3] F. C. ROBBINS, T. H. WELLER et J. F. ENDERS. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 673.
- [4] C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, **74**, 1179 ; **75**, 2202.
- [5] MARINESCO et MINEA. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **73**, 346.

ANTIBIOTIQUES ET RÉSISTANCE MICROBIENNE

par C. LEVADITI et J. HENRY-ÉVENO.

(*Institut Alfred Fournier.*)

Dans une note présentée ici-même [1], nous avons précisé le potentiel de résistance de 6 souches de *Staphylococcus aureus* (TW, Gen, H, F, T et Oxf.), potentiel évalué par rapport aux effets antibiotiques *in vitro* de l'Ilotycine. Nous avions désigné par le terme « *potentiel de résistance* » la faculté du microorganisme d'acquérir l'état réfractaire, faculté conditionnée par le nombre des éléments *R* pré-existant dans une population microbienne et susceptibles d'être sélectionnés sous le choc de « *groupements fonctionnels agressifs* » de l'antibiotique, lors des passages en série, et transmissible héréditairement. Il nous a été

donné de constater que, dans le groupe de staphylocoques examinés, il y avait lieu de distinguer :

a) *Des souches relativement insensibles.* Se sont montrées assez réfractaires *ab ovo* les souches TW et Gen, puisqu'elles ont accusé une *Dmb* (1) atteignant 500 μg par centimètre cube avant tout contact avec l'Ilotycine. Ces souches ont présenté une *DMr* de 1 000 μg après une seule phase en l'espace de six jours.

b) Deux souches, F et H, dont la *Dmb* égalait 100 μg par centimètre cube, sont devenues insensibles (*DMr* 1 000 μg) en trois phases et en l'espace de sept et huit jours.

c) Enfin, deux autres souches (T et Oxf.), éminemment réceptives (*Dmb* : 1 μg par centimètre cube), ont acquis, l'une (T) un état réfractaire accusé (1 000 μg par centimètre cube) en six phases et en l'espace de treize jours ; l'autre (Oxf.) une résistance faible (100 μg par centimètre cube) en quatre phases et en l'espace de trente-quatre jours.

Il en découlait que ces souches de *Staphylococcus aureus* se sont comportées différemment quant à leur potentiel de résistance ilotycinique. A côté de celles qui, ayant manifesté un état réfractaire assez intense à l'origine, ont vu leur potentiel d'insensibilité atteindre rapidement des valeurs fortement élevées, il y avait lieu d'en reconnaître d'autres, modérément aptes à devenir résistantes, et d'autres, enfin, chez lesquelles cette même aptitude s'est déclarée lentement et en de multiples phases.

Or, nous avons eu la curiosité d'étudier le degré du potentiel de résistance de ces 6 souches de staphylocoques à l'égard d'antibiotiques autres que l'Ilotycine, à savoir l'auréomycine, le chloramphénicol et la terrainycine. Ce sont les résultats fournis par cette nouvelle série d'essais qui font l'objet de la présente communication (même technique que celle qui nous a servi dans nos expériences par l'Ilotycine).

1^o *Potentiel d'état réfractaire vis-à-vis de l'auréomycine.* — a) *Les souches résistantes d'emblée* (Tw et Gen) se sont comportées comme si elles étaient éprouvées en présence de l'Ilotycine (*Cf. tableau et fig. I*). Après trois passages et en une seule phase, la *Dmb*, qui était de 500 μg par centimètre cube, a passé à une *DMr* de 1 000 μg par centimètre cube en l'espace de quatorze jours.

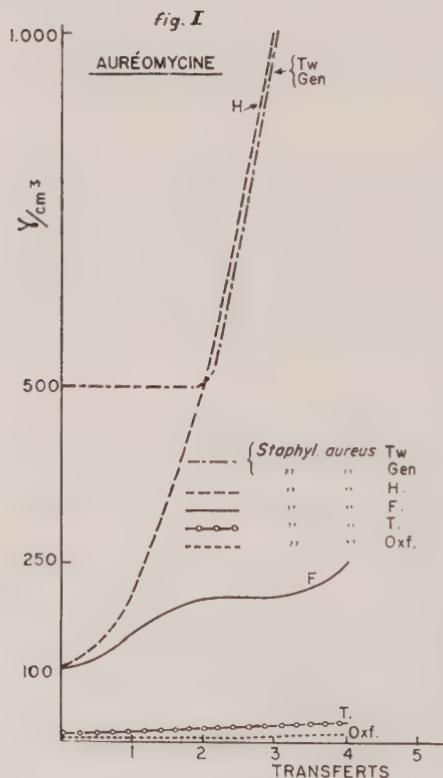
b) *Les souches moyennement sensibles* (F et H), qui offraient, au départ, une *Dmb* de 100 μg , ont acquis des *DMr* de 250 à 1 000 μg par centimètre cube, après 4 et 3 passages, en deux et trois phases et à un intervalle de 20 et 14 jours.

c) Enfin, les *souches éminemment réceptives* (T et Oxf) qui, au début, présentaient des *Dmb* de 10 et 5 μg par centimètre cube, ont atteint des *DMr* de 25 et 10 μg par centimètre cube, après 4 passages et en deux phases, l'essai ayant duré vingt jours. *En résumé, comportement très proche de celui de la résistance ilotycinique.*

2^o *Potentiel de l'état réfractaire vis-à-vis du chloramphénicol.* — Le tableau et la figure II montrent que l'ensemble de nos souches staphylocoques a présenté des potentiels de résistance contre le chloramphé-

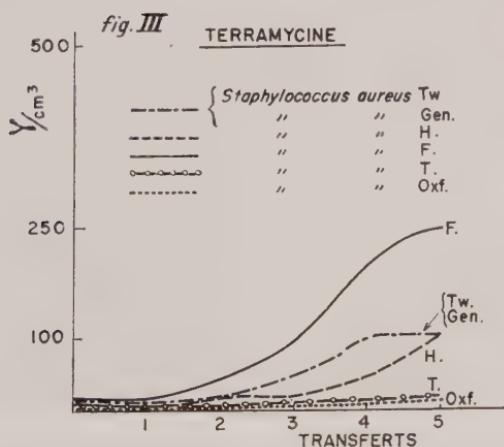
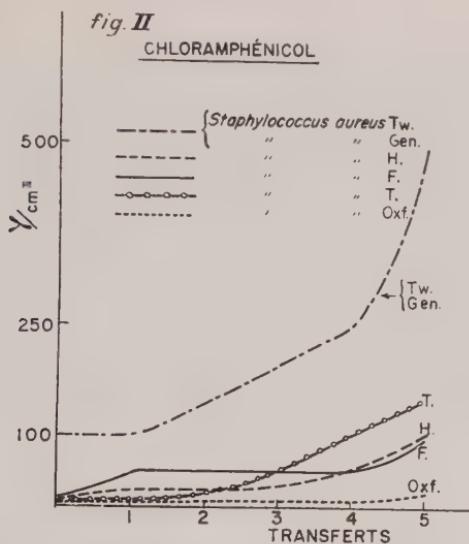
(1) Nous désignons par les abréviations *Dmb* la dose minima bactériostatique et *DMr* la dose maxima permettant la pousse des germes.

SOUCHES de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	ILOTYCINE						AURÉOMYCINE						CHLORAMPHÉNICOOL						TERRAMYCINE					
	Durée en jours			Nombre de phases			Durée en jours			Nombre de phases			Durée en jours			Nombre de phases			Durée en jours			Nombre de phases		
	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg	Dm _b par cm ³	en µg	DMr par cm ³	en µg
Tw, (résist.) .	6	1	3	500	1 000	14	1	3	500	1 000	15	3	100	500	12	2	2	5	10	400	100	10	100	
Gen. (résist.) .	6	1	3	500	1 000	14	1	3	500	1 000	15	3	100	500	12	2	2	5	10	400	100	10	100	
F.	7	3	5	100	1 000	20	2	4	100	250	15	3	100	100	12	3	4	10	250	10	10	250	10	
H.	8	3	5	100	1 000	14	3	3	100	1 000	15	3	100	100	12	3	4	10	100	10	10	100	10	
T.	13	6	8	1	1 000	20	2	4	100	250	15	3	100	100	12	2	2	5	10	400	100	10	100	
Oxf.	34	4	8	1	1 000	20	2	4	100	250	15	3	100	100	12	2	2	5	10	400	100	10	100	



nicol de valeur inférieure à celle du même potentiel des deux antibiotiques sus-mentionnés, l'Ilotycine et l'auréomycine. Ce potentiel fut

élevé pour les souches Tw et Gen (DMr , 500 μg par centimètre cube), des plus faibles pour la souche Oxf (DMr : 20 μg par centimètre cube), et moyen pour les souches F, H et T (100 et 200 μg par centimètre cube).



cube). Donc à peu près le même comportement que le potentiel d'état réfractaire *ilotycinique* et *auréomycinique*.

3^o *Potentiel de l'état réfractaire vis-à-vis de la terramycine.* — Le parallélisme dont il est question ci-dessus a cessé lorsqu'on a envisagé le potentiel de résistance terramycinique. Ici, ce potentiel a été, en général, bien moins accentué, attendu que, dans des conditions expérimentales identiques, il a oscillé entre un minimum de 10 et un

maximum de 250 µg par centimètre cube. Au surplus, une discordance manifeste est apparue du point de vue du comportement des souches staphylococciques examinées. En effet, la souche F a atteint une *DMr* de 250 µg par centimètre cube, alors que la même *DMr* des souches résistantes d'embrlée aux antibiotiques précédemment cités, Tw et Gen. est restée voisine de 100 µg par centimètre cube (*Cf. fig. III*).

CONCLUSION. — *L'ensemble de ces constatations montre que 5 souches staphylococciques se comportent, à quelques écarts près, identiquement, en ce qui concerne leur potentiel de résistance vis-à-vis de 3 antibiotiques dissemblables du point de vue de leur constitution chimique (soit l'Ilotyciné, l'auréomycine et le chloramphénicol), et dont l'un d'eux, la chloromycétine (tifomycine), est préparé synthétiquement. On est donc conduit à supposer que la fonction agressive de ces trois antibiotiques, fonction chimique agissant sélectivement sur les récepteurs (2) bactériens et conditionnant la genèse de résistance, est la même. La terramycine fait exception à cette règle. La gamme du potentiel réfractaire offre, de la sorte, un aspect quasi identique, quelle que soit la nature des trois sécrétions fungiques, envisagées sous l'angle de leur formule constitutive, de leurs constantes physiques, de leur spectre bactériostatique et de leur origine.*

BIBLIOGRAPHIE

[1] C. LEVADITI et coll. *Ces Annales*, 1953, **84**, 947.

L'APPAREIL FLAGELLAIRE DU BACILLE DE WHITMORE

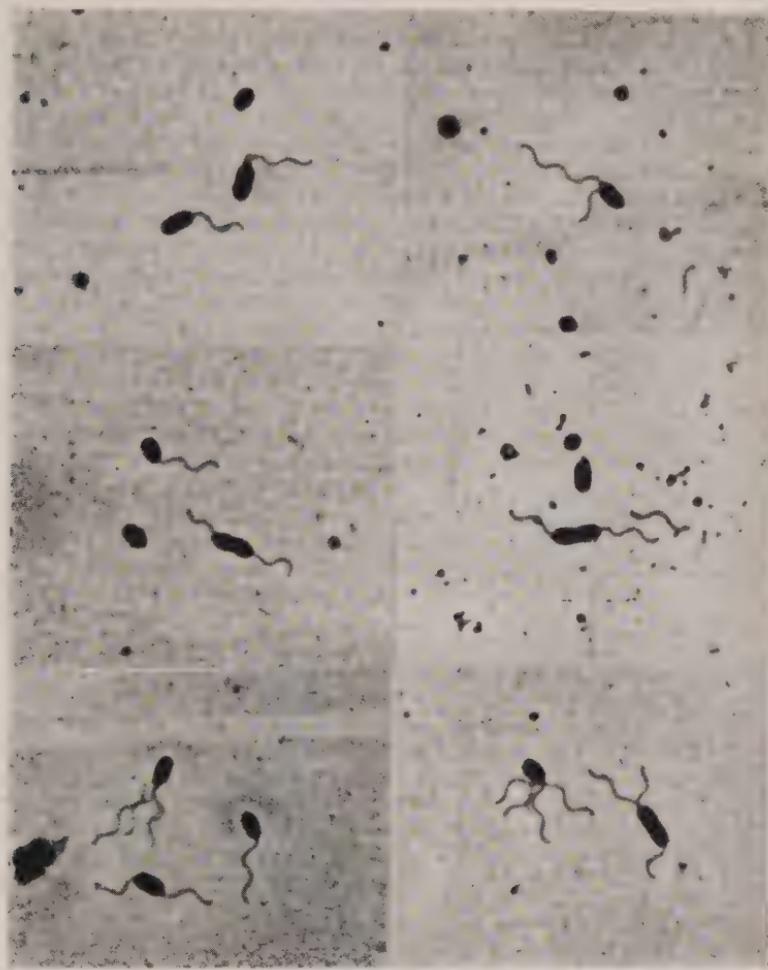
par P. DE LAJUDIE, J. FOURNIER et L. CHAMBON.

(*Institut Pasteur de Saigon.*)

Parmi les caractères du b. de Withmore les plus contradictoirement appréciés, il convient de citer le nombre des flagelles et leur mode d'implantation. Les discussions sur ce sujet ne sont pas purement académiques. Il s'y attache un intérêt taxonomique et, peut-être, phylogénique. C'est pourquoi nous croyons devoir apporter notre contribution au débat.

(2) Le terme « récepteur » signifie ici le groupement chimique enzymatique qui domine un catabolisme donné de l'appareil diastasique microbien. On sait qu'il s'agit, dans le cas de la pénicilline, d'un « trouble du processus enzymatique fondamental du catabolisme ribonucléique, la scission des nucléosides (accompagnée de phosphorylation) » [Macheboeuf, *Actualités pharmacologiques*, 1950, **4**, Masson, éditeur]. En ce qui concerne le chloramphénicol, l'auréomycine et la terramycine, il est question d'un empêchement de l'accumulation intracellulaire d'acide glutamique et d'une inhibition de la synthèse des protéines (GALE, *II^e Congrès internat. Biochimie*, Paris, 1952, Masson, éditeur).

La mobilité du b. de Whitmore ne fait de doute pour personne. Whitmore (1913) qui le décrivit le premier, et, après lui, Mc Dowell et Varney (1947), insistent sur le caractère spécial (« serpentine ») de cette mobilité, mais sans décrire l'appareil flagellaire. Même lacune



Cils du b. de Whitmore, souche C 141. Coloration de Casarès-Gil.
Gross. final : $1 \times 1\,800$ (microphotographies réalisées par le D^r M. Piéchaud).

dans les publications de Stanton et Fletcher (1921, 1925, 1927, 1932) qui sont à la base de nos connaissances sur le germe en cause, de même que dans différents ouvrages de base : Bergey (1948) et Topley et Wilson (1948).

Legroux et Génevray (1933) considèrent le b. de Withmore comme

péririche, et cette opinion est reproduite dans le traité classique de Dumas (1951). Pour Souchard (1932) et pour Vauzel (1952), les flagelles, au nombre de 8 à 20, ont une disposition péririche.

Pour Miller et ses collaborateurs (1948), le germe est lophotrichie. Cette opinion a été reprise récemment par Brindle et Cowan (1951), qui précisent que le bacille porte 1 ou 2 cils polaires généralement à un seul pôle, et illustrent leur publication de très belles et fort démonstratives microphotographies. En même temps, ils insistent sur la difficulté qu'on éprouve à colorer de façon satisfaisante les cils du b. de Whitmore, cils qui sont fins et fragiles et à partir desquels il est rare qu'on obtienne une préparation bien contrastée. Mais l'intérêt principal de la publication de Brindle et Cowan est que les auteurs tirent argument du caractère monotrichie ou lophotrichie du b. de Whitmore pour le rapprocher du bacille pyocyanique et proposer de le ranger dans la même famille.

Les auteurs français, depuis Legroux et Génevray (1933), ont insisté sur les caractères communs qui autorisent le groupement des 3 bactéries suivantes : b. de la morve, b. de Whitmore et b. pyocyanique. Legroux et Blanc (1949) ont exposé clairement les raisons biochimiques, lysotypiques, immunologiques et épidémiologiques d'un tel rapprochement. A Saigon, Capponi et Cros (1948), Alain, Saint-Etienne et Reynes (1949), Bryggo et de Jauréguiberry (1952) ont accumulé des faits épidémiologiques qui parlent en faveur du rapprochement Whitmore-pyocyanique.

Ainsi préparés à accueillir favorablement la suggestion de Brindle et Cowan, il nous a paru intéressant de vérifier les observations morphologiques dont les auteurs britanniques tirent argument.

TECHNIQUE :

La coloration des flagelles du b. de Whitmore est malaisée. Un choix judicieux doit intervenir sur les points suivants :

- a) Souche appelée à fournir les préparations ;
- b) Culture de cette souche ;
- c) Préparation des frottis ;
- d) Coloration des frottis.

a) *La souche.* — Celle qui nous a fourni les meilleurs résultats (S. C141) est, dans notre collection, parmi celles qui paraissent avoir le moins subi la dissociation M.

b) *Culture de cette souche.* — Il nous a paru avantageux de faire un passage sur cobaye et de cultiver sur gélose molle et sur gélose au sang les germes provenant d'une ponction du cœur chez l'animal infecté.

c) *Préparation des frottis.* — L'extrémité d'un ensemenceur chargée sur une culture de huit heures est déposée avec précaution dans 5 ml d'eau distillée. On maintient l'ensemenceur dans le liquide, *sans agiter*, jusqu'à ce que l'amas bactérien se soit dissocié et ait diffusé en trainées opalescentes. On prélève alors le liquide à la pipette avec précaution et on dépose une grosse goutte sur chaque lame d'une série parfaitement propre et dégraissée. On étale cette goutte par simple inclinaison de la lame, on laisse sécher lentement à l'abri des poussières et on entoure d'un trait de crayon gras la surface recouverte par le liquide.

d) *Coloration.* — Nous avons comparé les résultats fournis par trois méthodes :

Celle de Novel (1933) ;

Celle de Leifson (1938) modifiée par l'utilisation du « flagella stain » des Baltimore Biological Laboratories ;

Celle de Casarès-Gil rapportée par Dumas (1951).

C'est cette dernière qui nous paraît la meilleure dans les conditions de notre travail. Elle a rendu possibles les microphotographies qui illustrent notre texte et qui sont dues à l'obligeance du Dr M. Piéchaud, de l'Institut Pasteur, que nous tenons à remercier ici.

RÉSULTATS : Le b. de Whitmore porte de 1 à 4 flagelles à implantation polaire.

Les éléments les plus jeunes (cocco-bacillaires) sont monotriches. Les éléments plus âgés sont lophotriches. Mais l'implantation se fait toujours en un seul pôle tant que la division de la bactérie n'est pas apparemment commencée. Dès qu'un léger étranglement apparaît à la partie médiane du corps bactérien, on observe un ou plusieurs cils à chaque pôle. Nous n'avons jamais observé d'implantation bipolaire chez les éléments jeunes ne présentant pas d'étranglement médian.

Quand il existe plusieurs flagelles à un même pôle, il peut arriver que l'accolement de leur base au corps bacillaire donne l'apparence d'une implantation en des points espacés. Les flagelles, épaissis par la coloration, se présentent comme des filaments relativement recifiliques ou recourbés en crosse à leur extrémité libre. Parfois l'accolement de deux flagelles qui se séparent par la suite donne une apparence trompeuse de flagelle ramifié.

La longueur de ces éléments varie de 2,6 à 8 μ avec une moyenne de 3,8 μ .

Les images que nous avons observées et photographiées sont très semblables aux descriptions et aux photographies de Brindle et Cowan (*loc. cit.*).

CONCLUSIONS : Nos observations confirment celles des auteurs britanniques. *Malleomyces pseudomaltei* est bien une bactérie mono- ou lophotriches dont l'appareil flagellaire a une implantation polaire. Nous souscrivons à la proposition de Brindle et Cowan de le faire passer, en compagnie de *Malleomyces mallei* (1), de la famille des *Parvobacteriaceae* dans celle des *Pseudomonadaceae*. Il y retrouverait le bacille pyocyanique, dont les auteurs français ont signalé à maintes reprises les liens de parenté qui l'unissent au bacille de Whitmore.

BIBLIOGRAPHIE

M. ALAIN, J. SAINT-ETIENNE et V. REYNES. *Méd. Trop.*, 1949, **4**, 119.
 D. H. BERGEY. *Manual of determinative Bacteriology*, 6^e éd., 1948.
 C. S. BRINDLE et S. T. COWAN. *J. Path. Bact.*, 1951, **63**, 571.
 E. BRYGOO et P. DE JAUREGUIBERRY. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1952, **45**, 62.
 R. CAPPONI et R. CROS. Réunions Médico-Chirurgicales de Saigon-Cholon
 8 octobre 1948.
 J. DUMAS. *Bactériologie Médicale*, 1951.

(1) Que l'on conserve le nom générique *Malleomyces* ou qu'on le remplace par le nom générique *Loefflerella* (ce qui nous paraît peu souhaitable).

R. LEGROUX et J. GÉNEVRAY. *Ces Annales*, 1933, **51**, 249.
 R. LEGROUX et G. BLANC. *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 1949, **3**, 585.
 F. MAC DOWELL et P. L. VARNEY. *J. Amer. med. Assoc.*, 1947, **134**, 361.
 W. R. MILLER et al. *J. Bact.*, 1948, **155**, 115 et 127.
 L. SOUCHARD. *Arch. Inst. Pasteur Indochine*, 1952, **4**, 193.
 A. T. STANTON et W. FLETCHER. *Trans. 4th Congr. Far East Ass. Trop. Med.*, 1921, **2**, 196 ; *J. Hyg.*, 1925, **23**, 347 ; 1927, **26**, 31 ; *Inst. for Med. Res. Fed. of Malaya*, 1932, 21.
 W. W. TOPLEY et G. S. WILSON. *Principles of Bacteriology and Immunity*, 3^e édit., 1943.
 M. VAUCEL. *Médecine Tropicale*, 1^{re} édit., 1952.
 A. WHITMORE. *J. Hyg.*, 1913, **13**, 1.

**SENSIBILITÉ ET VITALITÉ
DES SOUCHES STREPTOMYCINO-RÉSISTANTES
DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
VIS-A-VIS DE L'ISONIAZIDE**

par J. VIALLIER, M^{me} R.-M. CAYRÉ et H. SERRE.

(Institut bactériologique de Lyon.)

Les modifications de la résistance à la streptomycine observées pour les souches de bacilles de Koch isolées de l'expectoration des tuberculeux pulmonaires traités par l'isoniazide, nous ont incités à étudier expérimentalement *in vitro* l'action de cet antibiotique sur des souches streptomycino-résistantes.

La parfaite sensibilité à l'isoniazide des bacilles streptomycino-résistants isolés chez les sujets n'ayant jamais reçu cet antibiotique a été amplement démontrée *in vitro* [1, 2, 3] et *in vivo* [4] par de nombreux auteurs. Une cinquantaine de bacilles que nous avons isolés de divers produits pathologiques, streptomycino-résistants à plus de 50 µg par centimètre cube, se sont montrés sensibles à 0,05 ou 0,1 µg par centimètre cube d'isoniazide.

Nous avons voulu, dans une première série d'expériences, voir si des repiquages successifs et rapides de souches streptomycino-résistantes en milieu non streptomyciné, mais contenant une faible quantité d'isoniazide, leur permettraient de récupérer une sensibilité à la streptomycine compatible avec une action thérapeutique de l'antibiotique. Sept souches de bacilles streptomycino-résistants et isoniazido-sensibles ont été ensemencées parallèlement en milieu de Dubos témoin et en milieu de Dubos contenant 0,05 µg par centimètre cube d'isoniazide. Cette concentration d'isoniazide, légèrement inférieure à la dose bactériostatique minimale, permettait dans les conditions de l'expérience une poussée légère. Des repiquages ont été effectués tous les dix jours, à partir des cultures obtenues, dans de nouveaux milieux contenant ou ne contenant pas d'isoniazide. Aucun de ces milieux ne contenait de streptomycine (tableau I).

TABLEAU I.

	SOUCHES						
	1	2	3	4	5	6	7
Sensibilité de la souche originelle	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	+ 20 ± 50	+ 100
Sensibilité après six passages en milieu de Dubos contenant 0,05 INH par cm ³	+ 100	+ 100	+ 100	Restée stérile.	+ 5 - 10	+ 1 - 5	+ 100
Sensibilité après six passages en milieu de Dubos témoin .	+ 100	+ 100	+ 100	+ 50 - 100	+ 5 - 10	+ 5 - 10	+ 100

Après six repiquages successifs nous avons de nouveau recherché la sensibilité à la streptomycine de chacun des repiquages terminaux, en milieu témoin et en milieu isoniazidé, ainsi que celle de la souche originelle, selon notre technique habituelle [5] utilisant le milieu liquide de Youmans sérum de cheval, et dans une zone allant de 1 à 100 µg.

Quatre sur les 7 souches utilisées ont gardé une streptomycino-résistance supérieure à 100 µg par centimètre cube. Les derniers repiquages en milieu isoniazidé d'une cinquième étant restés stériles, nous n'avons pas pu tester la streptomycino-sensibilité de ces bacilles. Pour deux souches enfin, la streptomycino-sensibilité a nettement augmenté, mais d'une façon superposable, au cours des repiquages dans les milieux témoins et dans ceux contenant une faible quantité d'isoniazide. Linz [6], Linz et Lecocq [7] ont montré que parmi une population bacillaire dont les germes ont des sensibilités différentes à la streptomycine, les bacilles résistants se multiplient plus lentement par comparaison avec les germes sensibles, si bien qu'au cours de repiquages successifs et précipités en milieu non streptomyciné, on a toute chance de voir diminuer la proportion de germes résistants, et, de ce fait, de noter une baisse de la résistance antérieurement constatée. L'isoniazide *in vitro*, dans nos conditions expérimentales, ne transforme pas les souches antérieurement résistantes en souches sensibles.

La vitalité des germes streptomycino-sensibles est-elle plus grande en présence d'isoniazide que celle des germes streptomycino-résistants ? Trois expériences ont été réalisées selon le principe suivant : une faible quantité de bacilles de la souche considérée a été mise en suspension dans une solution aqueuse d'isoniazide contenant par centimètre cube 1 000, 500, 250 µg d'antibiotique. Au bout de temps variables de séjour à l'étuve à 37°, une certaine quantité de la suspension bacillaire était centrifugée et le culot de centrifugation ensemencé après deux lavages successifs en milieu de Dubos liquide. Nous avons noté la durée du séjour nécessaire dans la dilution d'isoniazide pour empêcher toute culture ultérieure dans les réensemencements. Vingt-sept essais ont été réalisés, 14 avec des souches streptomycino-résistantes à + 100 µg

et 13 avec des bactéries sensibles à 1 µg de streptomycine. La sensibilité à l'isoniazide de ces souches variait de 0,05 à 20 µg, chiffre restant bien inférieur à celui de la concentration en antibiotique de la solution aqueuse utilisée (1 000 à 250 µg). Les résultats sont résumés dans le tableau II :

TABLEAU II.

SOUCHE UTILISÉE (souches humaines)	SENSIBILITÉ à la streptomycine en µg/cm ³	SENSIBILITÉ à l'isoniazide en µg/cm ³	CONCENTRATION d'isoniazide utilisée en µg/cm ³	DURÉE DE CONTACT maximum ayant permis une culture en heures	DURÉE DE CONTACT minimum ayant empêché toute culture en heures
M. J.	— 1	— 0,4	1 000		110
Heim.	+ 100	— 0,05	1 000		110
Col. R.	+ 100	— 0,4	1 000		110
Luil.	— 1	— 0,05	1 000		110
A.	+ 100	— 0,5	500	78	96
A.	+ 100	— 0,5	1 000	40	48
B.	+ 100	— 0,4	500	48	54
B.	+ 100	— 0,4	1 000	9	48
C.	+ 100	+ 5 — 10	500	24	48
C.	+ 100	+ 5 — 10	1 000	24	48
D.	— 1	+ 0,05	500	30	48
D.	— 1	+ 0,05	1 000	48	54
E.	— 1	+ 0,4 — 0,5	500		24
E.	— 1	+ 0,4 — 0,5	1 000	7	30
F.	— 1	+ 0,4 — 0,5	500	54	72
Tey.	+ 100	+ 20	1 000	49	55
Tey.	+ 100	+ 20	500	29	49
Tey.	+ 100	+ 20	250	55	102
Bar.	+ 100	— 0,05	1 000	24	49
Bar.	+ 100	— 0,05	500	24	49
Bar.	+ 100	— 0,05	250	24	29
Cob. Vi.	— 1	— 0,05	1 000	29	49
Cob. Vi.	— 1	— 0,05	500	29	48
Cob. Vi.	— 1	— 0,05	250	29	49
Geh.	— 1	+ 10	1 000	15	24
Geh.	— 1	+ 10	500	24	55
Geh.	— 1	+ 10	250	49	49

Nous ne voulons pas discuter ici de l'action bactéricide de l'isoniazide, nous réservant d'y revenir ultérieurement. Cette action a été étudiée par W. Steenken Jr et E. Wolinsky [8], G. Middlebrook [9], H. Noufflard et M. Deslandes [10]. Dans nos expériences, elle s'est manifestée au bout d'un temps variable selon la concentration d'isoniazide et selon la souche utilisée, mais nous n'avons pas noté de divergences dans le comportement des souches streptomycino-résistantes et streptomycino-sensibles et les premières ne nous ont pas paru avoir une vitalité moindre que les secondes en présence d'isoniazide.

Dans une dernière série de recherches enfin, 7 souches streptomycino-résistantes à + 100 µg et 1 à + 20 µg ont été mises en suspen-

sion, de la même façon que précédemment, dans une solution aqueuse contenant 10 µg par centimètre cube d'isoniazide. Après six jours de contact à l'étuve à 37° une certaine quantité de la suspension a été centrifugée et le culot, après deux lavages, ensemencé en milieu de Dubos. La streptomycino-résistance de ces repiquages a été recherchée, elle n'a pas été modifiée.

En conclusion, si les bacilles streptomycino-résistants sont sensibles, au même titre que les bacilles streptomycino-sensibles, à l'isoniazide, expérimentalement *in vitro*, cet antibiotique est incapable de faire disparaître une streptomycino-résistance acquise antérieurement. Il n'y a pas de différence nettement décelable entre la vitalité des deux groupes de souches et l'action bactéricide de l'isoniazide à fortes doses ne s'exerce pas plus rapidement sur les bacilles streptomycino-résistants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. LINZ et E. LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1444.
- [2] A. LUTZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1369.
- [3] J. BRUN et J. VIALLIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1332.
- [4] A. G. KARLSON et W. H. FELMAN. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **66**, 477.
- [5] J. VIALLIER, H. SERRE et Mme R. M. CAYRÉ. *Ces Annales*, 1953, **84**, 804.
- [6] LINZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 146.
- [7] LINZ et LECOCQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 143.
- [8] W. STEENKEN JR. et E. WOLINSKY. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 765.
- [9] G. MIDDLEBROOK. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 765.
- [10] H. NOUFLARD et M. DESLANDES. *Ces Annales*, 1952, **83**, 769.

SUR LA PERMÉABILITÉ DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE A LA PÉNICILLINE INJECTÉE PAR VOIE INTRACAROTIDIENNE

par V. SÍNCHEZ BAYARRI, A. GARCIA MARTINEZ et MILSON RESENDE.

(Valence, Espagne et University Medical School, Saint-Louis, U. S. A.)

L'un de nous a, depuis 1941, étudié le problème de l'introduction d'antibiotiques et d'autres agents pharmacologiques par voie artérielle, singulièrement par voie carotidiennne, par l'extrémité distale, en vue de fixer la tolérance et l'utilité thérapeutique dans certaines affections localisées aux centres nerveux [1]. Le problème ainsi posé n'a été étudié, à notre connaissance, que par Kowanow [2], et il a, à notre avis, de l'importance, étant donné l'imperméabilité à peu près totale de la barrière hémato-encéphalique normale aux antibiotiques. La question est intéressante dans les cas de maladies qui affectent le parenchyme du cerveau (encéphalites) avec intégrité des méninges. C'est un cas différent de celui qui se présente quand il y a une ménin-

gife, les antibiotiques traversant alors la barrière méningée avec une relative facilité.

Le problème que nous avons voulu résoudre a été celui de savoir si, en utilisant la voie carotidienne dans les conditions susdites, la pénicilline seule ou bien d'autres produits pourraient traverser les barrières hémato-encéphaliques normales. Nous avons opéré sur des chiens (1) auxquels on injectait par la voie carotidienne, extrémité distale, les produits à expérimenter, recueillant par ponction suboccipitale, le liquide céphalo-rachidien, dans lequel on recherche par la méthode du « tube-dilution », la présence et la concentration de l'antibiotique. Voici le résumé de nos résultats :

a) Injection par voie carotidienne de 10 000 unités par kilogramme de pénicilline dissoute dans l'eau distillée. Le liquide céphalo-rachidien prélevé trente minutes après ne contient pas de pénicilline. Le sang prélevé au même moment contient 50 unités de pénicilline par centimètre cube.

Nous avons trouvé les mêmes résultats que les chercheurs qui nous ont devancés, c'est-à-dire absence de perméabilité de la barrière méningée. Notre expérience prouve de nouveau que la voie artérielle par l'extrémité carotidienne distale, malgré l'inondation massive de l'antibiotique qu'elle apporte au cerveau, ne modifie pas les conditions de perméabilité des méninges.

b) Nous avons cherché à trouver un agent capable de modifier cette condition d'imperméabilité des méninges ; pour cela nous nous sommes d'abord adressés au facteur de diffusion de Duran-Reynals, la hyaluronidase. Deux expériences ont été faites avec 5 à 10 unités de hyaluronidase ajoutées à 10 000 unités de pénicilline par kilogramme (les animaux pesaient de 4 à 5 kg), le tout injecté par voie carotidienne. Le liquide céphalo-rachidien, extrait dix minutes après, ne contenait pas de pénicilline.

c) Même dispositif expérimental en ajoutant à la pénicilline 10 cm³ de solution aqueuse à 2 p. 100 de bleu de méthylène. Vingt-quatre heures avant on fait une injection de 1 cm³ d'essence de térébenthine pour provoquer la formation d'un abcès de fixation. Néanmoins, le liquide céphalo-rachidien extrait une heure après l'injection du mélange pénicilline-bleu de méthylène, ne contenait pas de pénicilline.

d) Dans cette expérience on a fait une association médicamenteuse : pénicilline (10 000 unités par kilogramme) avec le sulfathiazol, ajouté aux doses de 2,5 cm³ d'une solution à 2 p. 100, 2,5 cm³ d'une solution à 10 p. 100 et 4 cm³ d'une solution de sulfathiazol à 10 p. 100 ; le tout injecté par voie carotidienne. Prélèvement du liquide céphalo-rachidien après quinze minutes. Résultat : le liquide n'a aucun pouvoir bactériostatique et ni la pénicilline, ni le sulfathiazol n'ont traversé la barrière.

e) Expérience d'association de la pénicilline avec la caféine. Dans deux cas on a injecté 10 000 unités de pénicilline par kilogramme

(1) Nous remercions vivement le professeur de Physiologie Dr Garcia-Blanco, ses assistants J. Vinas et V. Anton et ses internes V. Jorro Molto et V. Marco Vinent, pour l'aide technique qu'ils nous ont constamment prêtée.

et ajouté de 0,01 g et 0,05 de caféine. Prélèvement du liquide céphalo-rachidien après quinze minutes. Celui-ci est absolument dépourvu de pouvoir bactériostatique. Dans une troisième expérience, à la même quantité de pénicilline on ajoute 0,1 g de caféine. Le liquide céphalo-rachidien, prélevé également après quinze minutes, montre un pouvoir bactériostatique équivalant à 0,5 unité par centimètre cube de pénicilline.

f) Expériences d'association pénicilline + urotropine. Pénicilline, 15 000 unités par kilogramme ajoutées à l'urotropine, solution aqueuse à 40 p. 100, 2 cm³. L'injection est faite comme d'ordinaire par voie intracarotidienne, sans incident. Extraction du liquide céphalo-rachidien après trente minutes. Dans une première expérience le liquide montre un pouvoir bactériostatique équivalant à 5 unités de pénicilline par centimètre cube. Dans une deuxième expérience, le liquide n'a aucun pouvoir bactériostatique. Une expérience faite avec un chien témoin, auquel on injecte seulement 2 cm³ de solution d'urotropine seule, n'a pas non plus révélé de pouvoir bactériostatique.

g) Expérience d'association de pénicilline et de théophilline. Injection de 20 000 unités par kilogramme de solution aqueuse de pénicilline avec 0,006 g de théophilline par kilogramme. La quantité de pénicilline injectée par voie carotidienne est la plus élevée. Elle s'est faite sans aucun incident. Le liquide céphalo-rachidien, prélevé après vingt minutes, ne montre pas de pouvoir bactériostatique.

Résumé : Il résulte de toutes ces expériences que la voie carotidienne se prête parfaitement à l'introduction de pénicilline, sulfathiazol, urotropine, etc., sans aucun incident important chez l'animal, aux doses indiquées. Cette voie est donc possible, ce qui ne veut pas dire qu'elle soit préférable à d'autres, étant donné la complexité technique de l'intervention. Les centres nerveux ne souffrent nullement de l'inondation médicamenteuse que représente l'injection par l'extrémité distale carotidienne de ces produits. Cette voie ne présente pas de réels avantages pour le traitement des processus encéphalitiques, car la pénicilline ne traverse pas en quantités importantes, malgré cette technique, la barrière hémato-encéphalique. Il faut cependant retenir que les associations pénicilline-caféine et pénicilline-urotropine sont les seules qui ont permis de constater le passage de petites quantités de l'antibiotique, quoique ce passage ne soit pas constant. En dernier lieu, il faut remarquer que, même par cette voie, aux fortes doses employées, la pénicilline seule ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique lorsque celle-ci est intacte.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. RESENDE. *Rev. Brasil. Medicina*, 1952, 9.
- [2] V. V. KOWANOW. *Khirurgia*, 1947, in *Physiol. Rev.*, 1952, 32.

**TECHNIQUE SIMPLIFIÉE
POUR L'ÉTUDE DE L'ACTION BACTÉRICIDE
DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES**

par YVES CHABBERT (1).

(Laboratoire de l'Hôpital de l'Institut Pasteur.)

Dans une série de travaux, Jawetz et Gunnison [2, 3] ont montré que l'action des associations d'antibiotiques dépendait de leur action bactéricide. Ils ont donné des règles très générales en insistant sur les grandes variations de souches à souches. En France, René Marfin et coll. [4] ont montré l'application clinique de telles recherches dans la détermination de l'antibiotique de choix. Dans une note antérieure [1] nous avons proposé une technique rapide dont le principe est le suivant :

La technique consiste à réaliser une suspension de germes dans un milieu liquide contenant des concentrations déterminées d'antibiotiques isolés et associés. Ces concentrations sont prises dans la zone des concentrations humorales. Après un certain temps de contact, le nombre de germes capables de survivre est apprécié par culture sur gélose.

Cette technique étant destinée à permettre, dans un cas clinique donné, de choisir le plus rapidement possible la meilleure association, il est apparu nécessaire d'en standardiser les éléments et de simplifier les manipulations.

La préparation quotidienne des solutions d'antibiotiques présentant une perte de temps dans un laboratoire clinique, il est possible de les remplacer par des disques séchés, imprégnés au préalable d'une quantité d'antibiotique telle, qu'immégrés dans un tube contenant un certain volume de milieu ensemencé, ils libèrent l'antibiotique à la concentration désirée.

La numération exacte du nombre des survivants est inutile, car il apparaît que l'intérêt clinique doit être centré sur la recherche des synergies nettes. Aussi un repiquage des tubes sous forme de stries sur gélose donne des résultats suffisamment lisibles.

Préparation des disques séchés. — Des disques de papier buvard (force 40 kg) de 10 mm de diamètre sont imprégnés avec 50 mm³ des solutions-mères supérieures aux concentrations théoriques par suite des pertes se produisant en cours de dessiccation.

ANTIBIOTIQUE	SOLUTION MÈRE	TAUX obtenu après immersion dans 2 cm ³ de milieu
Pénicilline.	420 U.O./cm ³	1 U.O./cm ³
Pénicilline.	500 U.O./cm ³	10 U.O./cm ³
Streptomycine.	600 µg/cm ³	10 µg/cm ³
Chloramphénicol	800 µg/cm ³	15 µg/cm ³
Terramycine	400 µg/cm ³	5 µg/cm ³

(1) Nous remercions Mlle J. Hervé pour son assistance technique.

La dessiccation se fait sous courant d'air chaud en présence de desséchant. Toute la préparation doit se faire de façon stérile, de préférence dans un bloc stérile.

Les concentrations obtenues doivent être contrôlées par titrage. La mise en suspension complète des antibiotiques est de l'ordre de quinze minutes. La conservation à l'état sec est au minimum de quatre mois.

Milieu de culture :

Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	2,5 pH 7,5
Phosphate monopotassique	0,7
Phosphate disodique	8,3
Eau	1 l

TECHNIQUE. — Premier temps. — Ensemencer 25 cm³ de milieu avec 0,1 cm³ d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon du germe à étudier pour les germes aérobies banaux (0,5 cm³ pour les streptocoques). Mais l'inoculum peut être insuffisant dans certains cas. Il est bon de faire avec le milieu ensemencé une strie longitudinale sur un tube de gélose inclinée. On doit obtenir une culture continue, sinon recommencer le titrage avec dix fois plus de germes.

Prendre 10 tubes de Kahn stériles et répartir les disques avec une pince flambée de la façon suivante :

	NUMÉRO DES TUBES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pénicilline	P	P	P	P	S	S	S	C	C	AT
Streptomycine	S									
Chloramphénicol		C				C				
Auréo-terramycine			AT			AT		AT		AT

Repartir ensuite avec une pipette stérile 2 cm³ de milieu ensemencé dans tous les tubes. Boucher les tubes avec du coton stérile. Agiter. Laisser une heure sur la table du laboratoire. Agiter de nouveau. Mettre à l'étuve à 37° pendant seize à dix-huit heures.

Deuxième temps. — Couler dans une boîte de Petri 25 cm³ de milieu gélosé convenable. Sécher les boîtes. Prélever une anse dans chaque tube (de préférence avec une anse de 2 mm de diamètre en platine) et faire une strie de 5 cm de long.

Lecture. — L'importance de la culture des survivants peut être notée de la façon suivante :

Absence de culture	0
Moins de trois colonies	±
Colonies isolées	+
Colonies denses	++
Nappe	+++

Le résultat peut être figuré ainsi :

Exemple :

	P(10)	S(10)	C(15)	AT(5)
P(10)	+	0	++	++
S(10)	"	+++	++	++
C(15)	"	"	+	+
AT(5)	"	"	"	+

(Synergie) .

Comparer la densité des cultures obtenues à partir des tubes contenant les antibiotiques isolés et les associations. Rechercher et noter les cas où il y a *synergie*, c'est-à-dire lorsque le nombre des survivants obtenu avec une association est inférieur à celui obtenu avec l'antibiotique isolé le plus actif ; le nombre peut être égal ou supérieur. On se trouve alors en présence, soit d'une association indifférente, soit d'un ralentissement d'action bactéricide sans traduction clinique nette.

Remarques. — 1^o Pour la pénicilline, il existe deux sortes de disques qui permettent d'obtenir des solutions titrant 1 et 10 U. O./cm³. On choisit la première pour les souches qui sont sensibles à moins de 0,20 U. O./cm³ par la technique habituelle de détermination de la sensibilité ; la seconde pour les souches plus résistantes. En cas d'association favorable, on pourra conseiller un traitement en rapport avec ces taux.

2^o Les résultats obtenus avec l'auréomycine et la terramycine sont en général assez voisins. La terramycine est préférée pour la préparation des disques en raison de sa plus grande stabilité. Les résultats obtenus avec elle sont applicables aux deux antibiotiques sans erreur grossière.

3^o Le temps de contact avant repiquage des survivants, fixé à seize-dix-huit heures, n'est pas absolu. Avec les germes facilement tués par les antibiotiques qui donnent très peu de survivants en dix-huit heures, on peut rechercher la vitesse d'action bactéricide des différentes associations en repiquant au bout de trois et six heures. Au contraire, si l'on veut étudier l'action finale des associations, on peut utiliser un inoculum dix fois plus fort et repiquer au bout de un, trois, cinq jours par exemple.

Cette technique vise principalement à déterminer les synergies nettes lorsqu'elles existent. Par contre, des différences faibles d'activité sont peu importantes. Enfin, la traduction clinique des antagonismes est douteuse.

L'étude de l'action bactéricide des associations ne présente un intérêt clinique que dans les cas où une action bactériostatique s'avère insuffisante.

Résumé. — On propose une technique simplifiée d'étude de l'action bactéricide des associations dans laquelle les solutions d'antibiotiques sont obtenues par des disques séchés, imprégnés au préalable, qui libèrent l'antibiotique à la concentration désirée. L'évaluation des survivants se fait en stries sur gélose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. CHABBERT. Ces *Annales*, 1953, **84**, 545.
- [2] E. JAWETZ, J. B. GUNNISON, J. B. BRUFF et V. R. COLEMAN. *J. Bact.*, 1952, **64**, 29.
- [3] E. JAWETZ et J. B. GUNNISON. *Antib. et Chemoth.*, 1952, **2**, 243.
- [4] René MARTIN, Y. CHABBERT et B. SUREAU. *Presse Méd.*, 1952, **61**, 168.

**RECHERCHES SUR LA SUBSTANCE NUCLÉAIRE
DE *BIFIDIBACTERIUM BIFIDUM*
ET D'*ACTINOBACTERIUM CELLULITIS***

par A.-R. PRÉVOT et C. MAZUREK.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

L'étude de la substance nucléaire dans le genre *Sphaerophorus* a conduit Dienes et ses collaborateurs [1], puis Prévot et Raynaud [2], à admettre, en dehors de la reproduction par division directe, un deuxième cycle de multiplication par conjugaison proto-sexuelle, dont la phase la plus caractéristique est le sphéroïde (« large body » des auteurs anglo-américains). A plusieurs reprises, au cours de ses recherches sur la systématique [3] des Actinomycétales anaérobies, l'un de nous a émis l'hypothèse qu'il y avait une similitude cytologique, d'une part, entre les renflements et les sphéroïdes des *Sphaerophoraceae* (Actinomycétales Gram-négatives) et, d'autre part, les renflements en massues des *Actinomycetaceae* (Actinomycétales Gram-positives).

Nous avons voulu voir si cette hypothèse pouvait être vérifiée par la même méthode de coloration élective de la substance nucléaire qui a été utilisée par Prévot et Raynaud pour la recherche citée plus haut [2]. C'est donc la méthode de Robinow que nous avons utilisée pour ce travail, en employant pour l'hydrolyse, de l'HCl N/1 agissant pendant huit à dix minutes à 60° et la coloration des corps microbiens ainsi traités par le Giemsa pendant vingt minutes.

Nous avons choisi pour cette étude 2 souches d'*Actinomycetaceae* de notre collection d'anaérobies donnant des renflements en massue très visibles : soit *Bifidibacterium bifidum* souche TM et *Actinobacterium cellulitis* souche 394 A. Nous mettons en regard la coloration de Gram et la coloration de Robinow-Giemsa de chacune d'elles pour comparaison.

A titre de référence, nous avons pratiqué les mêmes manœuvres sur une souche d'actinomycète aérobie, *Actinomyces bovis* souche 854 A (1).

(1) Qui nous a été aimablement donnée par notre collègue Segretain, chef du Laboratoire de Mycologie, que nous remercions vivement.

Nous avons réuni dans la planche ci-jointe d'un côté les photomicrographies des 3 microbes colorés par la méthode de Gram (1, 3 et 5), de l'autre côté, en face de chacune des premières, les photomicrographies des préparations colorées par la méthode de Robinow (2, 4 et 6).

Cette juxtaposition permet de voir que chacun des microbes étudiés possède deux sortes de granulations nucléaires :

1^o De petits granulations nucléaires assez peu colorées par le Giemsa après hydrolyse chlorhydrique ménagée, correspondant à la substance nucléaire soit des bâtonnets normaux, non renflés, soit à la section non renflée d'un ensemble possédant des massues et des bifurcations ;

2^o De grosses granulations nucléaires très fortement colorées par le



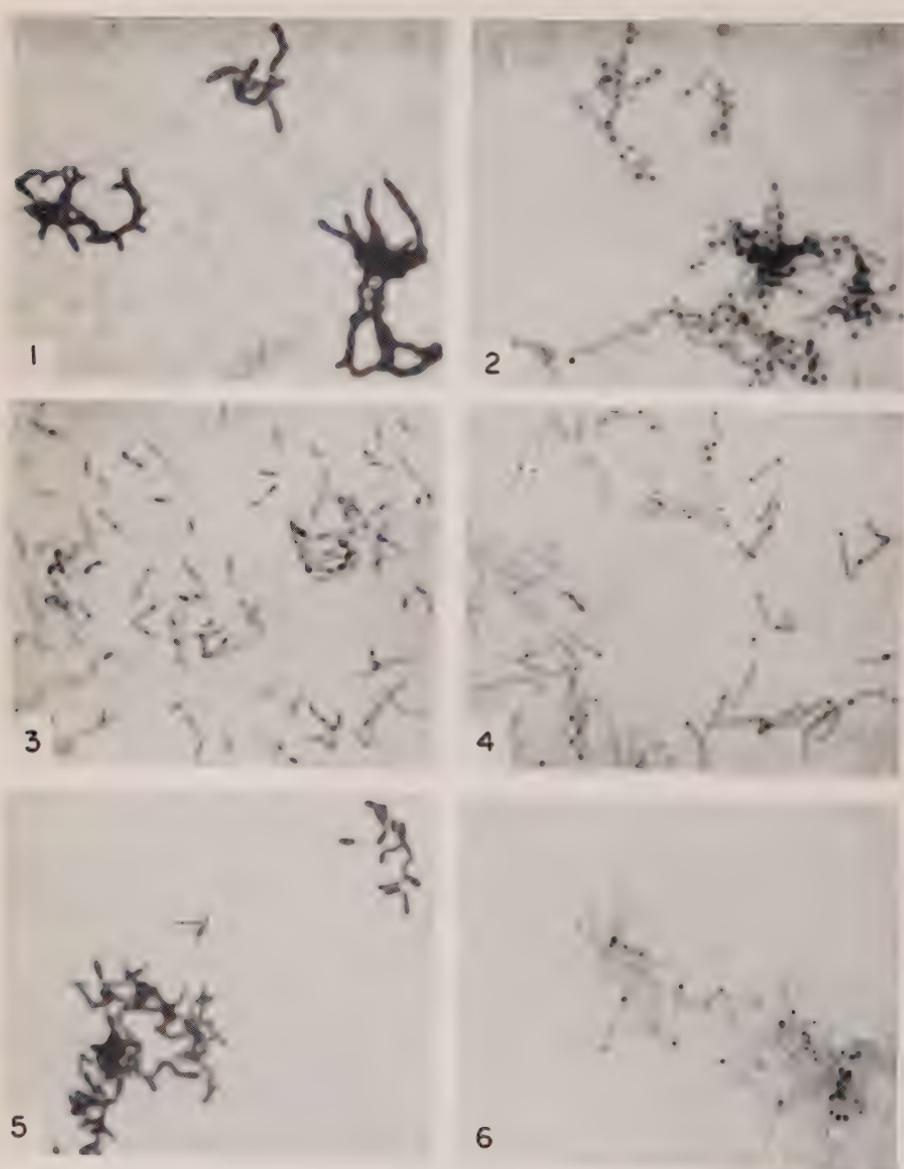
Giemsa et correspondant aux renflements en massue et à la naissance des ramifications.

Nous n'avons pu réaliser, pour des raisons matérielles, qu'un nombre restreint de photomicrographies. Par contre, nous avons dessiné un nombre important de préparations et nous avons composé, grâce à ces nombreux dessins, la synthèse de nos observations en superposant sur le même dessin, très agrandi, le contour d'un *Actinobacterium* et la position respective des petites et des grosses granulations nucléaires. De nos observations microscopiques directes, de nos dessins et de nos photographies, nous concluons :

1^o Les renflements en massue de *Bifidibacterium* et d'*Actinobacterium* présentent un gros granule nucléaire très coloré, contrastant avec les petits granules moins colorés des bâtonnets non renflés.

2^o Le point de jonction des ramifications présente également un gros granule nucléaire très coloré.

3^o Le renflement en massue correspond donc à une aire de multiplication de la substance nucléaire et bien que le mécanisme intime de cette multiplication n'apparaisse pas sur les préparations traitées par la méthode de Robinow-Giemsa, on peut admettre que les renflements



ments en massue des *Actinomycetaceae* sont les équivalents des sphéroïdes des *Sphaerophoraceae*.

4^o Le même ordre de faits s'observe chez *Actinomyces bovis*, aérobiose, ce qui est une raison de plus pour ne pas séparer le groupe anaérobiose strict *Bifidibacterium-Actinobacterium* du groupe aérobiose *Actinomyces*, dont tous les caractères morphologiques et cytologiques permettent d'affirmer l'homogénéité taxonomique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DIENES et coll. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1941, **47**, 385 ; 1942, **51**, 297 ; 1943, **53**, 195 ; *J. Bact.*, 1942, **44**, 37 ; 1943, **45**, 21 ; 1944, **48**, 125.
- [2] A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1948, **74**, 334.
- [3] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1938, **60**, 285 ; 1946, **72**, 2 ; *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit., 1948, Masson, édit., Paris.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

1. *Bifidibacterium bifidum*. Coloration de Gram.
2. *Bifidibacterium bifidum*. Giemsa après Robinow.
3. *Actinobacterium cellulitis*. Coloration de Gram.
4. *Actinobacterium cellulitis*. Giemsa après Robinow.
5. *Actinomyces bovis*. Coloration de Gram.
6. *Actinomyces bovis*. Giemsa après Robinow.

ÉTUDE DE L'ISO-HEMAGGLUTININE ANTI-T CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

A. EYQUEM, E. JOCHEM, L. PODLIACHOUK et P. MILLOT.

(*Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie
et des Groupes sanguins.*

Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

L'agglutinine anti-T est mise en évidence à l'aide de globules rouges du groupe O traités par un enzyme sécrété par *Vibrio cholerae* en quantité importante. Cette agglutinine a été étudiée chez l'homme par de nombreux auteurs, dont Friedenreich [1, 2, 3]. Chez l'animal, seul Friedenreich a étudié la répartition de son titre en examinant un certain nombre de chevaux ou de moutons.

Il était intéressant, à la lumière des résultats récemment obtenus dans l'individualisation des antigènes érythrocytaires des animaux, de comparer la présence d'un de ces antigènes avec les titres moyens de cette agglutinine.

Chez les chevaux, nous avons obtenu au laboratoire [4] l'individualisation de 5 antigènes érythrocytaires principaux, A, C, D, E, F, et pu reconnaître des chevaux ne possédant aucun de ces antigènes ; nous

avons considéré que ces animaux appartenaien au groupe O, leurs globules rouges n'étant pas agglutinés par aucun des iso-immunsérum obtenus. Nous avons donc pu nous servir des globules de ces animaux pour étudier l'agglutinine anti-T existant chez 182 chevaux. Nous avons pratiqué le titrage de cette agglutinine en nous servant de 0,5 ml de dilution de sérum mis en contact avec 0,1 ml de suspension globulaire à 2 p. 100. Ces globules avaient été traités au préalable par un filtrat provenant de la culture d'une bactérie (4 B) isolée par l'un de nous et formant un enzyme de type RDE.

Le résultat de l'agglutination était apprécié après une heure à la température du laboratoire et centrifugation à 1 000 tours pendant deux minutes. Chaque série d'agglutination était effectuée en se servant d'un sérum témoin permettant de comparer les titres obtenus. Nous avons constaté qu'il n'y avait pas de relation entre la présence d'un

TABLEAU I. — Corrélation entre la présence des antigènes érythrocytaires A, C, D, E, chez le cheval et le titre de l'isohémagglutinine anti-T.

Cheval	0	10	20	30	40	60	80	120	160	240	320	480	MOY	NBR
Croisement A	1	4	5	19	10	6	22	9	2	I	I	-	51	86
Croisement C	2	4	0	21	10	8	25	13	3	2	I	-	40	103
Croisement D	-	-	I	4	-	2	2	3	I	-	I	-	20	14
Croisement E	1	1	2	6	9	2	4	2	2	I	I	1	69	81
Croisement G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	3

TABLEAU II. — Corrélation entre la présence des antigènes érythrocytaires A, B, C, D, chez le mulet et le titre de l'isohémagglutinine anti-T.

Mulet	0	10	20	30	40	60	80	120	160	240	320	480	MOY	NBR
Groupe A	1	6	6	2	I	3	5	3	3	2	-	-	36	32
Groupe B	1	6	6	1	2	I	4	2	2	3	-	-	70	28
Groupe C	2	3	3	2	I	5	7	3	2	2	-	-	74	30
Groupe D	-	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	13	4
Groupe G	-	-	-	1	-	4	I	2	2	I	-	-	73	11

TABLEAU III. — Corrélation entre la présence des antigènes érythrocytaires A, B, C, chez le mouton et le titre de l'isohémagglutinine anti-T.

Mouton	:NBR:MOY:10:20:30:40:60:80:I20:I60:240:320:480:640:

Groupe A	: 17:I78: 3: 3: 1: 3: 1: 2: -: 1: 1: 2:

Groupe B	: 31:I40: 2: 3: 6: 5: 3: 8: -: 2: 1: 1:

Groupe C	: 19:I93: 2: 4: 3: 2: 1: 2: -: 1: 2: 2:

Groupe O	: 4:260: -: I: -: -: I: -: I: -: -: I:

TABLEAU IV. — Répartition de l'agglutinine anti-T chez les chevaux, mulets et moutons.

	:NBR: 0 : 10 : 20 : 30 : 40 : 60 : 80 :I20 :I60 :240 :320 :480 :640 :

	:I82: 3: 5: 12: 22: 29: 23: 48: 13: 16: 5: 4: 2:
CHEVAUX	-----
	% : 1.6: 2.8: 6.6:I2.1:I5.9:I2.6:26.4:7.1: 8.8: 2.8: 2.2:I4.1:

	: 60: 2: 8: 10: 2: 7: 6: 11: -: 7: 6: I: -:
MULETS	-----
	% : 3.4: I3.3:I6.7:3.2: II.7:I0.0:I8.3: -: II.7:I0.0:I.7: -:

	: 53: -: -: -: 3: 10: 8: 7: 4: 11: -: 4: I: 5:
MOUTON	-----
	% : -: -: -: 5:47: I8.7:I5.1:I3.2:7.6: 20.8: -: 7.6: I.9: 9.4:

antigène érythrocytaire et l'importance du titre de l'agglutinine anti-T et qu'il n'y avait pas non plus de relation entre la nature et la durée de l'immunisation anti-bactérienne et anti-toxique et le titre de l'agglutinine. Pour les chevaux, le titre moyen est d'environ 1/80 et la répartition se fait suivant une courbe de Gauss.

Nous avons examiné, de plus, 60 mulets qui possèdent certains antigènes d'origine équine en même temps qu'un antigène B d'origine asine pour certains [6, 8]. Il n'y a pas non plus, dans le cas de ces animaux, de relation entre la présence de l'antigène et le taux de l'agglutinine. Il semble, cependant, qu'on trouve plus fréquemment chez le mulet des titres inférieurs à 1/80.

Le sérum de 3 chevaux et de 2 mulets ne contenait pas d'agglutinine anti-T décelable. Les titres varient entre 1/10 et 1/480 pour les autres animaux.

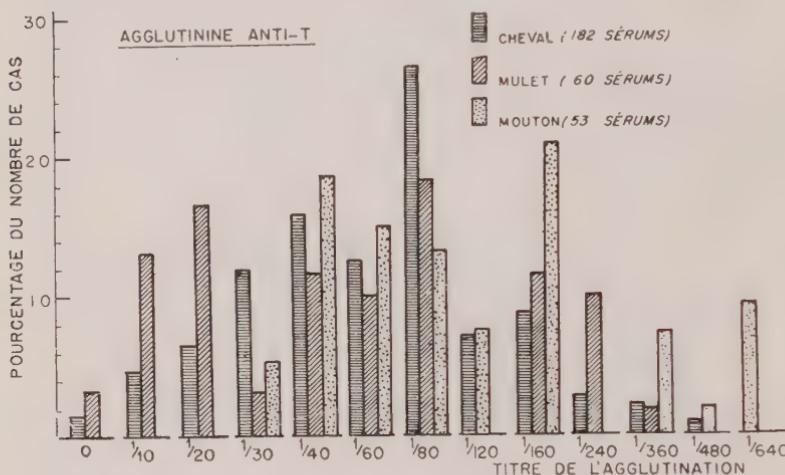
L'examen répété de différents animaux a montré qu'il n'y avait pas de variation du titre d'agglutinine au cours de plusieurs mois.

Chez le mouton, l'individualisation d'animaux considérés comme du groupe O ne possédant aucun des antigènes reconnus [7] a permis

l'examen de 53 animaux. L'étude de la répartition des titres de cette agglutinine a montré que le taux moyen était de 1/165, les titres étant compris entre 1/30 et 1/640.

Dans l'ensemble, la répartition des titres de ces agglutinines est assez semblable chez le Cheval, le Mouton et l'Homme.

On peut attribuer l'origine de l'agglutinine anti-T à une immuni-



sation hétérophile dont on ignore encore l'étiologie. S'il en est ainsi, on devrait trouver des animaux présentant un titre largement supérieur à celui rencontré habituellement. L'observation de malades présentant des globules rouges polyagglutinables ayant un caractère antigénique commun avec les globules rouges traités par l'enzyme RDE légitime certaines recherches dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. FRIEDENREICH et T. ANDERSEN. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1929, **6**, 236.
- [2] N. FAUCON. *Thèse Doctorat en Médecine*, Paris, 1952.
- [3] A. EYQUEM et N. FAUCON. *Ces Annales*, 1953, **84**, 662.
- [4] L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. *Ces Annales*, 1952, **83**, 405.
- [5] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MILLOT. *Ces Annales*, 1952, **83**, 576.
- [6] A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK. *Ces Annales*, 1952, **83**, 57.
- [7] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, A. EYQUEM et P. MILLOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1448.
- [8] A. EYQUEM. *Rapport au 1^{er} Congrès national de Transfusion*. Alger, 1953.
- [9] A. EYQUEM. *Assises Intern. de la Transf.*, Liège, 1952. *Rev. Méd. de Liège*.

TORULOSE SPONTANÉE CHEZ LE COBAYE

par G. DEZEST.

(*Laboratoire d'Anatomie pathologique.
Institut Pasteur, Paris.*)

Un lot de 5 cobayes inoculés avec une culture de bacille tuberculeux humain et soumis à l'examen histopathologique nous a permis de constater chez l'un d'entre eux une torulose généralisée.

L'autopsie n'a intéressé que les organes habituellement prélevés pour

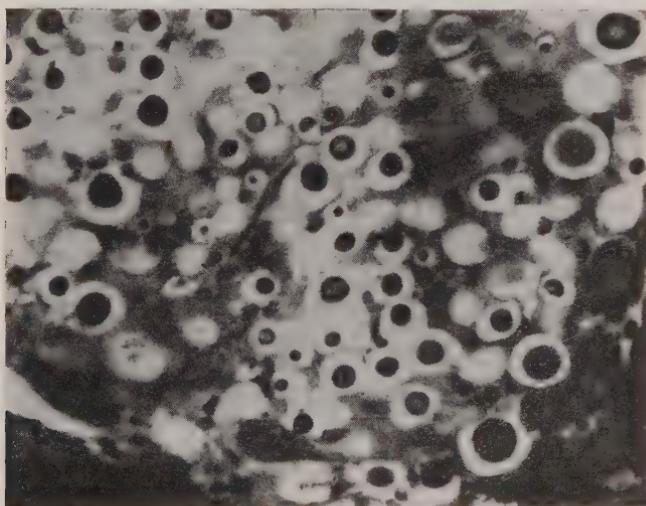


FIG. 1. — N° S 646. Torulose spontanée du cobaye. Pancréas.
Coloration hémalun-éosine. Gross. : 330.

ces expériences, à savoir : les poumons, le pancréas, le foie, les ganglions lymphatiques lombaires et inguinaux, incidemment l'atmosphère conjonctivo-adipeuse périviscérale.

La répartition des éléments mycosiques est très variable. Très abondante dans les poumons et le pancréas, importante dans les espaces périviscéraux, leur densité est moindre dans les autres organes.

Morphologiquement, les *Torulopsis* ont une forme arrondie ou ovaleaire de dimensions variant de 2 à 20 μ suivant leur degré d'évolution et leur situation dans les parenchymes. Pourvu d'un noyau central prenant très fortement les colorants basiques, leur cytoplasme éosinophile est homogène et se condense à la périphérie en une capsule

d'autant plus marquée que les éléments sont plus développés, particulièrement bien colorée par la fuchsiléine. La plupart sont isolés, parfois 2 par 2 avec un parasite de dimension beaucoup plus faible, relié au voisin par un pont protoplasmique. Nous n'avons observé que de très rares éléments monoliformes et, malgré la richesse des préparations, l'absence de formes de division.

L'étude histologique des différentes pièces ne montre pas de réaction tissulaire au niveau du *Torulopsis*. On constate une lyse cellulaire périphérique au contact d'un halo entourant la capsule avec flétrissure de la membrane cytoplasmique et disparition du noyau par effacement sans pycnose visible.

Dans le foie, les parasites se rencontrent dans le tissu conjonctif

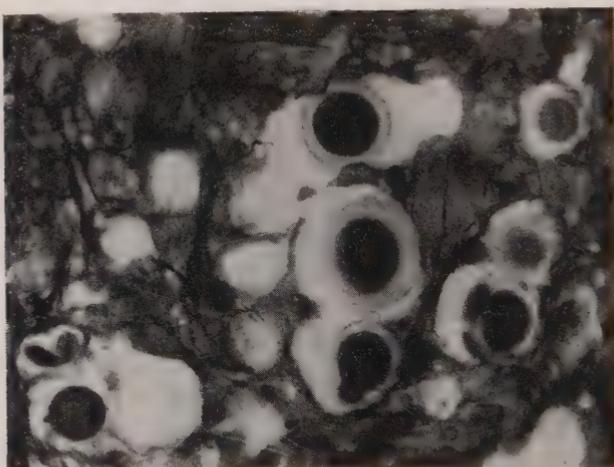


FIG. 2. — N° S 646. Torulose spontanée du cobaye. Poumon.
Imprégnation argentique de la réticuline. Gross. : 530.

des espaces porto-biliaires ou des veines centro-lobulaires, quelques-uns semblent isolés dans le parenchyme sur le trajet des capillaires radiés, d'autres siègent dans les micro-nodules dus à la lésion tuberculeuse expérimentale.

Dans la rate, les *Torulopsis* sont dans les zones corticale et médullaire sans répartition bien nette par rapport aux constituants vasculaires ou lymphoïdes.

Dans le poumon, ils occupent l'emplacement des alvéoles dont ils ont effondré les cloisons, laissant subsister en dernier lieu les fibres élastiques.

Les ganglions en confiennent ainsi que le pancréas où les parasites se développent plus activement que dans les autres organes, découpant de vastes lacunes dans les acini et les flots de Langhans.

Enfin, ils sont très nombreux mais de plus petite taille dans les

tissus périviscéraux, mêlés sans ordre aux cellules adipeuses dont les parois sont restées intactes.

L'envahissement semble se faire par les voies sanguines, ainsi que l'ont démontré Drouhet et Segretain [4] par le contrôle des hémocultures positives en cours de maladie expérimentale.

En conclusion, la découverte fortuite d'une torulose chez un cobaye inoculé avec une souche de culture de bacille tuberculeux humain nous a permis de décrire une maladie spontanée chez un animal qui, jusqu'ici, semblait ne contracter cette affection que par inoculation expérimentale.

BIBLIOGRAPHIE

[4] E. DROUHET et G. SEGRETAIN. *Rev. Path. comp.*, 1950, 50, 37. Contient un index bibliographique.

ESSAIS INFRACTUEUX DE VACCINATION CONTRE LA MYXOMATOSE DES LAPINS PAR ANAVIRUS TISSULAIRE

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

(*Institut Pasteur. Service de Microbiologie Animale.*)

On sait que, indépendamment de son aptitude caractéristique à engendrer la formation de tissu myxomateux, le virus de Sanarelli détermine une septicémie d'une durée d'une semaine environ au cours de laquelle la plupart des parenchymes sont virulents. Il y a là, avec l'évolution des pestes animales, une analogie qui nous a incités à rechercher si, comme dans ces affections épizootiques (pest bovine, peste porcine, peste aviaire), les pulpes parenchymateuses des lapins atteints de myxome, stérilisées par le formol et additionnées d'un adjuvant, posséderaient, à quelque degré, le pouvoir de vacciner.

Les expériences rapportées ci-dessous ont été effectuées sur des lapins domestiques, le matériel antigène étant emprunté tour à tour à des tissus divers.

Suspension de pulpe splénique. — On prélève les rates de 2 lapins de garenne ayant contracté naturellement la maladie et de 1 lapin domestique inoculé de myxome, tous sacrifiés *in extremis*. On en fait une pulpe fine qu'on dilue dans 5 parties d'eau physiologique formolée à 4 p. 1 000 ; on ajoute, immédiatement après, une quantité de gel d'alumine égale à la quantité de pulpe splénique et on conserve à la température du laboratoire.

Deux jours après, alors que le virus a été tué par le formol, on injecte la suspension à 3 lapins, chacun d'eux en recevant 4 cm³ par voie hypodermique.

Ces lapins sont éprouvés, l'un par scarifications virulentes après

quinze jours, un autre par cohabitation avec un malade, vingt jours après, le troisième par inoculation après trois mois. Tous les 3 contractent la myxomatose et meurent comme le font les témoins neufs.

Suspension mixte de parenchyme testiculaire et de myxome. — A partir de ces tissus empruntés aux mêmes lapins, on prépare une suspension en tous points semblable à la suspension splénique considérée ci-dessus.

Deux jours après, on injecte à 2 lapins 7 cm³ de cette suspension. Eprouvés, l'un par scarifications virulentes après quinze jours, l'autre par cohabitation avec un malade, après trois semaines, ils contractent la maladie et en meurent dans les délais habituels.

Suspension de membranes chorio-allantoïdes d'œuf de poule. — On broie au mortier les parties lésées de 15 membranes chorio-allantoïdes ayant servi à des passages de virus sur œuf embryonné ; et selon la technique indiquée plus haut, on prépare une suspension formolée additionnée de gel d'alumine.

Trois jours après, on injecte la suspension à 3 lapins à raison de 4 cm³ par animal. Eprouvés, l'un par scarification virulente, un autre par cohabitation avec un malade, après deux semaines, le dernier par inoculation sous-cutanée après neuf semaines, ils meurent de myxomatose dans des délais ordinaires.

Produit de la digestion du tissu myxomateux par l'hyaluronidase. — Ainsi que nous l'avons signalé dans une note antérieure [1], on peut, par des inoculations multiples de virus dans le derme de la région dorso-lombaire, provoquer la formation de masses tumorales très importantes ; à titre d'exemple, sur un lapin de 3,500 kg qui avait reçu vingt injections de 0,10 cm³ d'une suspension testiculaire virulente, nous avons prélevé, huit jours plus tard, une tumeur expérimentale qui pesait 220 g. Une masse aussi considérable ne pourrait être broyée commodément qu'après congélation ; au lieu de cela, nous nous sommes proposé de la soumettre après passage au broyeur de Latapie, alors qu'elle se présentait avec la consistance d'un magma visqueux, à l'action de l'hyaluronidase, afin d'hydrolyser le tissu myxomateux et d'en dégager le virus sous une forme se prêtant à l'usage (1). Employé à raison de 100 TRU par gramme de tissu, dose peut-être supérieure à celle qui suffirait à conduire au résultat recherché, l'hyaluronidase agit en quelques minutes et laisse un déchet fibreux qui ne représente pas, en poids, le 1/6 de la substance du myxome.

Le produit de l'hydrolyse, parfaitement liquide, est débarrassé du reliquat fibreux par passage sur gaze. Sa teneur en virus de Sanarelli, établie par inoculation au lapin, est d'environ 10 000 unités par centimètre cube. Maintenu à la glacière, il conserve ce titre pendant plus de deux mois.

Le virus ainsi dégagé par l'enzyme a été formolé puis additionné de gel d'alumine selon la technique en usage et on l'a injecté à deux séries de lapins, les uns le recevant en une fois, les autres en trois fois et toujours sous un volume important (5 à 10 cm³ d'un mélange

(1) Nous remercions vivement ici nos collègues, les Drs Béquignon et Boquet, qui ont bien voulu mettre à notre disposition cette hyaluronidase.

contenant 1/3 de virus). Eprouvés dans les semaines suivantes par inoculations virulentes ou par cohabitation avec des malades, les 8 lapins mis en expérience ont contracté une myxomafose mortelle dans les délais habituels.

CONCLUSION. — Quelle que soit la nature de la matière organique mise en œuvre : pulpes splénique, testiculaire, tumorale, membranes chorio-allantoïdes, liquide obtenu par action de l'hyaluronidase sur le tissu myxomateux, il ne paraît pas possible de préparer un anavirus formolé susceptible d'immuniser le lapin vis-à-vis du virus de Sanarelli.

BIBLIOGRAPHIE

[4] H. JACOTOT et A. VALLÉE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 614.

SUR LA CELLULOLYSE ANAÉROBIE DU SOL

par J. KAUFFMANN et P. TOUSSAINT.

(*Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer.*
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)

Le travail exposé ici a pour but de rechercher l'activité cellulolytique anaérobie de différentes terres dans des milieux de culture de composition différente où l'anaérobiose a été réalisée soit par le vide, soit par fixation d'oxygène.

Nos expériences ont porté sur une terre de culture de France (région de Toulouse) et sur une terre d'A. O. F. (région de basse Côte d'Ivoire).

Nous avons utilisé les milieux de culture suivants :

1 ^o Solution saline de Winogradsky	5 cm ³
Sulfate d'ammonium	0,2 g
Carbonate de calcium	0,2 g
Eau distillée	100 cm ³
2 ^o Solution de Winogradsky	5 cm ³
Nitrate de potassium	0,2 g
Carbonate de calcium	0,2 g
Eau distillée	100 cm ³
3 ^o Solution de Winogradsky	5 cm ³
Nitrate de potassium	0,2 g
Carbonate de calcium	0,2 g
Sulfate de calcium	0,2 g
Eau distillée	100 cm ³
4 ^o Solution de Winogradsky	5 cm ³
Sulfate d'ammonium	0,2 g
Chlorure de calcium	0,2 g
Eau distillée	100 cm ³

Milleux additionnés de :	TERRE DE FRANCE						TERRE TROPICALE						
	(Milleu au $CO_3 Ca$)			(Milleu au $CO_3 Ca$)			(Milleu au $Cl_2 Ca$)			(Milleu au $Cl_2 Ca$)			
	Activité cellulolytique	Noircissement du milieu	Dégagement gazeux (en cm^3 à la PA)	Activité cellulolytique	Noircissement du milieu	Dégagement gazeux (en cm^3 à la PA)	Activité cellulolytique	Noircissement du milieu	Dégagement gazeux (en cm^3 à la PA)	Activité cellulolytique	Noircissement du milieu	Dégagement gazeux (en cm^3 à la PA)	
N° de tubes	Vide de : 1/2 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 10 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 10 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 10 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 1/2 min	Vide de : 10 min	
$SO_4 (NH_4)^2$	1	+++	+++	+++	+++	4,2	4	+++	+++	0,2	0,2	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	4,5	4,1	+	++	+	0,1	0	+++
$NO_3 K$	1	++	++	0	0	15,5		++	+	0	0,3	0,4	+++
	2	++	++	0	0	14		+	++	0	0,3	0,3	+++
$NO_3 K$ + $SO_4 Ca$	1	+++	+++	0	0	4	4,5	+	++	0	0,3	0,1	+
	2	+++	+++	0	0	4,7		+	++	0	0,2	0,2	

* Activité cellulolytique : + : papier faiblement attaqué; ++ : papier morcelé; +++ : papier entièrement attaqué.
Noircissement du milieu : 0 : milieu limpide; + : milieu légèrement brun; ++ : milieu brun noir; +++ : milieu noir.

Le carbonate de calcium des milieux 1, 2 et 3, seuls milieux utilisés pour la terre de France à pH 7,2, tamponne le milieu de culture à un pH voisin de 7,2.

Les milieux au chlorure de calcium, non tamponnés, ont un pH voisin de celui de la terre d'Afrique utilisée (pH 5,5).

La source carbonée est fournie sous forme de bandes de papier-filtre sans cendres, de dimensions 1 x 5 cm. Les différents milieux de culture sont répartis dans des tubes à essais à raison de 5 cm³ de milieu par tube. Chacun de ceux-ci est ensemencé avec 1 g de terre préalablement séchée à l'air et broyée.

Au cours d'une première expérience, un vide partiel a été réalisé dans un premier lot de tubes à essais après les avoir maintenus une demi-minute sous un vide de 1,5 cm de mercure, la dépression étant mesurée à l'aide d'un manomètre à mercure. Dans ces conditions, il reste encore quelques bulles d'air dans le milieu de culture.

Dans un deuxième lot, le scellage a été effectué après maintien du vide de 1,5 cm de mercure pendant dix minutes.

Dans une deuxième expérience, les tubes à essais ont été seulement bouchés au coton puis introduits dans un dessiccateur, sans vide préalable, dans lequel l'oxygène est absorbé par du pyrogallate de sodium.

Après deux mois de culture à l'étuve à 29°, nous avons déterminé l'activité cellulolytique par l'aspect de la bande de papier plus ou moins dégradée. Nous avons noté également la coloration et mesuré le dégagement de gaz produit dans les tubes scellés. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique suivante :

L'extrémité effilée des tubes scellés sous vide est introduite dans le conduit du tube de caoutchouc à vide relié au manomètre à Hg, précédemment étalonné avec un volume d'air connu à la pression atmosphérique. Le vide est réalisé à 1,5 cm de Hg, la communication avec la trompe à vide est fermée à l'aide d'un robinet. On brise alors l'extrémité du tube effilé. Le déplacement du ménisque de Hg, indiquant les variations de pression, permet de mesurer le volume de gaz contenu dans le tube. Dans les conditions de l'expérience, le manomètre s'est montré sensible à 0,1 cm³ de gaz à la pression atmosphérique.

Les résultats sont résumés dans le tableau.

L'activité cellulolytique dans les milieux sous cloche a été pratiquement nulle.

CONCLUSIONS. — De cette expérience on peut conclure que :

1^o Alors que la cellulolyse sous vide (partiel ou total) est généralement très prononcée, elle est pratiquement nulle dans une atmosphère privée seulement d'oxygène.

2^o La cellulolyse anaérobiose de la terre tropicale (à pH acide) est plus active dans un milieu acide, non tamponné, que dans un milieu tamponné à pH neutre.

3^o La qualité de la source azotée ajoutée dans le milieu de culture [$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ou NO_3K] ne semble pas influer sur l'activité de la cellulolyse anaérobiose.

4^o L'activité cellulolytique est aussi active sous un vide partiel que sous un vide total.

5^o La production de substance noire n'a lieu que dans les milieux au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Cette production n'a pas lieu dans les milieux au NO_3K additionnés de SO_4Ca .

Les milieux présentant une coloration noire dégagent une forte odeur de SH_2 . L'ion SO_4^{2-} provenant du SO_4Ca ne subit donc pas le même métabolisme que l'ion SO_4^{2-} provenant du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

La substance noire est sans doute formée uniquement de sulfures (caractérisation très positive par le sous-acéate de plomb).

6^o Le dégagement de gaz n'est pas fonction du noircissement du milieu de culture.

Le dégagement gazeux est pratiquement nul dans les milieux ensemencés avec la ferre tropicale en milieu alcalin. Par contre, on note un certain dégagement dans les milieux acides.

La terre de France a donné un dégagement gazeux nettement supérieur à celui donné par la terre d'Afrique.

Les milieux aux nitrates ont donné le maximum de dégagement gazeux (probablement dû à un dégagement d'azote gazeux produit par la microflore dénitritante utilisant les produits de dégradation de la cellulose comme source carbonée).

BIBLIOGRAPHIE

[1] S. WINOGRADSKY. Ces *Annales*, 1926, 40, 480.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Incidence des types biochimiques parmi les types bactériophagiques de *Salmonella typhi*, par M. PAVLATOU et P. NICOLLE.

Méthode pratique de dosage microbiologique du phosphore. Application au dosage du phosphore dans les terres, par J. KAUFFMANN.

Action du phosphore sur l'activité des germes nitrificateurs et dénitrificateurs du sol, par J. KAUFFMANN et M^{me} G. BOQUEL.

Le Gérant : G. MASSON.